

Reinigung und Eigenschaften
der Alanin-Dehydrogenase
aus Halobakterium Salinarium

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Diamandis Keradjopoulos
aus Thessaloniki/Griechenland

1976

Reinigung und Eigenschaften
des Alanin-Dehydrogenases
aus Halobacterium salinarum

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Reinigung und Eigenschaften der Alanin-Dehydrogenase aus Halobakterium Salinarium

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum**

von

**Diamandis Keradjopoulos
aus Thessaloniki/Griechenland**

Dissertation eingereicht am: 25.4.1976

Tag der mündlichen Prüfung: 26.3.1976



Referent: Prof. Dr. A.W. Holldorf

Korreferent: Prof. Dr. P. Fortnagel

2. KAPITEL

3. KAPITEL

4. KAPITEL

5. KAPITEL

6. KAPITEL

7. KAPITEL

8. KAPITEL

9. KAPITEL

10. KAPITEL

11. KAPITEL

12. KAPITEL

An meine verstorbenen Eltern

13. KAPITEL

14. KAPITEL

15. KAPITEL

16. KAPITEL

17. KAPITEL

18. KAPITEL

19. KAPITEL

20. KAPITEL

21. KAPITEL

22. KAPITEL

23. KAPITEL

24. KAPITEL

25. KAPITEL

26. KAPITEL

27. KAPITEL

28. KAPITEL

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	9
1. Biologisches Material	9
1.1. Herkunft der verwendeten Bakterienstämme	9
1.2. Verwendete Nährböden	9
1.2.1. Flüssigmedium	9
1.2.2. Festes Medium	10
2. Behandlung des biologischen Materials	10
2.1. Dauerkulturen	10
2.1.1. Kultur der Bakterien	10
2.1.2. Anzucht der Bakterien zur präparativen Gewinnung von Enzymen	11
3. Analytisch-chemische Methoden	12
3.1. Proteinbestimmung	12
3.2. Messung von Enzymaktivitäten	12
3.2.1. Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1)	12
3.2.2. Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)	13
3.2.3. Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.2)	13
3.2.4. Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2)	14
3.2.5. Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42)	14
3.2.6. Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	15
3.2.7. Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	15
3.2.8. NADH ₂ -Oxydase	16
4. Isolierung der Alanin-Dehydrogenase aus H. salinarium	16
4.1. Zellaufschluß zur Gewinnung des Rohextraktes	16

4.2. Hitzedenaturierung	17
4.3. Fällung mit verdünnter Essigsäure	17
4.4. Fraktionierte Ammoniumsulfat- Fällung	18
4.5. Adsorption an Hydroxylapatit	18
4.6. 1. Chromatographie an Hydroxylapatit	19
4.7. 2. Chromatographie an Hydroxylapatit	20
4.8. Chromatographie an DEAE-Cellulose	21
5. Physiko-chemische Untersuchungen	22
5.1. Diskontinuierliche Polyacrylamidgel- Elektrophorese	22
5.2. Bestimmung der Enzymaktivität an Polyacrylamidgelen	23
5.3. Isoelektrische Fokussierung	23
5.4. Chromatographie an Sephadex-Gel G-100	25
5.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	25
5.6. Zirkulardichroismus und optische Rotationsdispersionsmessungen	25
6. Herkunft der verwendeten Substanzen	28
III. ERGEBNISSE	29
7. Thermotoleranter Charakter extrem halophiler Bakterien	29
7.1. Thermophiler Charakter von Enzymen aus extrem halophilen, thermotole- ranten Bakterien	30
8. Reinigung der Alanin-Dehydrogenase aus H. salinarium	30
8.1.1. Zellaufschluß zur Gewinnung des Rohextraktes	31

8.1.2. Fraktionierte Hitze-Denaturierung	31
8.1.3. Fällung des Enzyms im sauren pH-Bereich	33
8.1.4. Saure Ammoniumsulfat-Fraktionierung	35
8.1.5. Adsorption an Hydroxylapatit	36
8.1.6. 1. Chromatographie an Hydroxyl- apatit	37
8.1.7. 2. Chromatographie an Hydroxyl- apatit	38
8.1.8. DEAE-Ionenaustauscher-Chromato- graphie	39
8.1.9. Übersicht über den gesamten Reinigungsschritt	41
8.2. Eigenschaften der Alanin-Dehydroge- nase	42
8.2.1. Kinetische Untersuchungen	42
8.2.1.1. Einfluß der Natriumchloridkon- zentration auf die Reaktions- geschwindigkeit	42
8.2.1.2. Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit	43
8.2.1.3. Die Abhängigkeit der Reaktions- geschwindigkeit von der Sub- stratkonzentration	44
8.2.1.4. Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit	46
8.2.1.5. Einfluß von einwertigen und zweiwertigen Kationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit	49

8.2.1.6. Einfluß von Anionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit	51
8.2.2. UV-Spektrum	52
8.2.3. Molekulargewichtsbestimmungen	53
8.2.3.1. Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase durch Sephadex-Gel-Filtration	53
8.2.3.2. Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase durch SDS-Elektrophorese	55
8.2.4. Bestimmung des isoelektrischen Punktes	58
8.2.5. Inaktivierung und Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase durch Wechsel der Salzkonzentration	60
8.2.5.1. Die Bedeutung von SH-Gruppen für die reversible Inaktivierung der Alanin-Dehydrogenase	64
8.2.5.2. Salzabhängige Hysterese der Alanin- Dehydrogenase	65
8.2.5.3. Nachweis von Veränderungen der Sekundärstruktur der Alanin- Dehydrogenase durch Zirkulärdi- chromismus und optische Rotations- dispersion	67
VI. DISKUSSION	78
V. ZUSAMMENFASSUNG	91
LITERATUR	93

I. EINLEITUNG

Die meisten Organismen sind nur in Gegenwart recht niedriger Salzkonzentrationen lebensfähig. Eine Ausnahme bei den Pflanzen bilden die Halophyten (61) und bei den Bakterien die Halobakterien¹⁾ (31).

Diese Organismen haben im Laufe der Evolution eine Abhängigkeit von wesentlich höheren Salzkonzentrationen erlangt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Problemen der Enzymologie halophiler Bakterien. Auf diese werden deshalb die folgenden Überlegungen beschränkt.

Systematisch bilden die halophilen Bakterien nach Bergey's Manual (5) eine eigene Familie, die Halobacteriaceae. Diese gliedern sich wiederum in die Halobakterien und in die Halococcen. Es sind aerob wachsende, gram-negative Stäbchen mit lophotricher Begeißelung und einer rot-orangen Färbung. Sie entwickeln kein Gas und bilden keine Sporen. Die Generationszeit beträgt bei 37°C auf optimalem Medium etwa 7 Stunden (29, 31).

Je nach Grad der Salzabhängigkeit unterscheidet man

1. Geringfügig halophile Bakterien
2. Mäßig halophile Bakterien
3. Extrem halophile Bakterien

¹⁾ $\alpha\lambda\alpha\varsigma$ = Halas = Salz

Die extrem halophilen Bakterien zeigen einige Besonderheiten im Bau einzelner Zellorganellen sowie in ihrem Stoffwechsel, die alle jedoch vorerst keinen Anhalt für eine Erklärung des halophilen Charakters dieser Organismen bieten. Die bisher gefundenen wesentlichen Besonderheiten sind:

Bakteriorhodopsin bildet in Zellhüllen der extrem halophilen Bakterien zusammen mit der Lipidschicht Flächenkristalle hexagonaler Struktur, die als Purpurmembran aus den Zellen isoliert werden können (28, 47).

Muraminsäure und einfache Zucker, wesentliche Bestandteile der Zellmembranen anderer Bakterien, kommen bei extrem halophilen Bakterien nicht vor. Zellhüllen extrem halophiler Bakterien besitzen jedoch einen großen Anteil an α -, ϵ -Diaminopimelinsäure und einen geringen Anteil an Aminosuckern (32, 43).

Die Halobakterien sind nicht zur Synthese von Malonyl-CoA befähigt und können deshalb keine höheren Fettsäuren aufbauen. Ebenso vermögen sie exogene Fettsäuren nicht zu verwenden und ihre Lipide sind ausschließlich isoprenoider Natur (27).

Die wichtigsten Vertreter der extrem halophilen Bakterien, *H. salinarium*, *H. cutirubrum* und *H. halobium* können keine Kohlenhydrate als exogene Kohlenstoff-

quelle verwerten; sie sind auf Aminosäuren als G-Quelle angewiesen (31, 60). Daher können sie nur in komplexen Bouillonmedien oder in synthetischen Medien, die einige essentielle Aminosäuren enthalten, wachsen (12).

Die extrem halophilen Bakterien sind nicht nur salztolerant, sondern strikt salzabhängig. Sie benötigen für die Aufrechterhaltung ihrer vitalen Funktionen mindestens 12 - 20 % Natriumchlorid. Für optimales Wachstum sind 25 % Natriumchlorid erforderlich. Natriumchlorid kann dabei nur sehr begrenzt durch andere Salze gleicher Ionenstärke im Medium ersetzt werden (29, 31, 32, 48). Bei Natriumchlorid-Konzentrationen unter 5 bis 10 % wandeln sich die roten Stäbchen zu kugelförmigen Gebilden um, die rasch lysieren (43).

Neben der hohen Kochsalzkonzentration benötigen sie für optimales Wachstum 0,1 bis 0,5 M Mg^{++} , ca. 0,03 bis 0,07 M K^{+} und Spuren von Metallionen (Fe^{++} , Ca^{++}) (29, 31, 32, 48).

Da die extrem halophilen Bakterien hohe Salzkonzentrationen für optimales Wachstum benötigen, sind sie einem ungewöhnlich hohen osmotischen Druck ausgesetzt.

CHRISTIAN und WALTHO (7) berichten erstmals über hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen extrem halophiler Bakterien während der verzögerten

Wachstumsphase. Durch die hohe Salzkonzentration im Zellinneren wird der osmotische Druck des Kulturmediums kompensiert. Die Zusammensetzung der Salze im Kulturmedium und im Zellinneren ist allerdings unterschiedlich. Innerhalb der Zellen ist eine hohe Kaliumkonzentration vorhanden, die während des Wachstums sehr wenig variiert (29). Wie oben bereits erwähnt, sind die Zellen dagegen auf eine hohe äußere Natriumchloridkonzentration angewiesen. Für *H. salinarium* wurden folgende Konzentrationsverhältnisse zwischen Zellinnerem und dem Nährmedium gefunden (7)

	$\text{Na}^+(\text{M})$	$\text{K}^+(\text{M})$	$\text{Cl}^-(\text{M})$
Extrazelluläre Konzentration	4,0	0,032	4,032
Intrazelluläre Konzentration	1,37	4,57	3,61
Verhältnis intrazelluläre/ extrazelluläre Salzkonzentration	0,34	143	0,9

Diese Befunde wurden durch Untersuchungen von GINZBURG et al. (11) an verschiedenen Species halophiler Bakterien aus dem Toten Meer bestätigt. Während der intrazelluläre K^+ -Spiegel dieser Zellen in allen Wachstumsphasen konstant bleibt, verändern sich die Konzentrationen von Na^+ und Cl^- . In der stationären Phase z.B. steigt die Na^+ -Konzentration von 0,5 auf 0,7 M; die Cl^- -Konzentration von 2,3 auf 2,9 M.

Für die Aufrechterhaltung der hohen intrazellulären Salzkonzentrationen müssen deshalb effektive energieabhängige Transportsysteme vorhanden sein. Die notwendige Energie wird in den Zellen über ein besonderes energielieferndes System gewonnen.

Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß das Bakteriorhodopsin, der wesentliche Bestandteil der Purpurmembran der halophilen Bakterien, eine lichtgetriebene Protonenpumpe darstellt, die Lichtenergie in die Energie eines elektrochemischen Gradienten umwandelt. Diese Energie scheint sowohl unmittelbar als auch über eine vorherige ATP-Bildung für die Einstellung der Salzkonzentrationen zur Verfügung zu stehen (47).

Die hohe intrazelluläre Salzkonzentration ist dringend erforderlich für den Ablauf der verschiedenen lebenswichtigen Stoffwechselprozesse. Sowohl die für den Ablauf dieser Prozesse notwendigen Enzyme als auch ein Teil der Zellorganellen sind nur aktiv, solange die erforderlichen Salzkonzentrationen vorhanden sind. Gut untersucht ist das Verhalten von Ribosomen aus extrem halophilen Bakterien.

70-S-Ribosomen von *H. cutirubrum* sind nur in Lösung mit 3 bis 4 M K^+ und 0,1 bis 0,4 M Mg^{++} stabil. K^+ ist dabei nicht durch andere Ionen zu ersetzen. Die erforderlichen Mg^{++} -Konzentrationen sind hier mehr als eine Zehnerpotenz

höher als die für die Stabilität von anderen prokaryonten Ribosomen erforderlichen Konzentrationen. Bei geringeren Konzentrationen von K^+ oder von Mg^{++} dissoziieren die Ribosomen von *H. cutirubrum* zunächst in 52-S und 31-S-Untereinheiten und dann weiter in 42-S-, 33-S- und 22-S-Partikel sowie in lösliche Proteine (2, 29). Eine zellfreie Proteinsynthese ist nur in Anwesenheit von 3,8 M KCl, 1,0 M NaCl und 0,4 M NH_4Cl möglich (3).

Aktive Transportmechanismen werden ebenfalls von den Konzentrationen an NaCl und KCl beeinflusst. So erfolgt bei *H. halobium* ein durch Licht induzierter Transport von Leucin optimal bei je 1,5 M NaCl und KCl (40). Ein Transport von Glutamat bei *H. salinarium* ist dagegen nur bei 4 M NaCl wirksam (57).

Enzyme von extrem halophilen Bakterien zeigen in ihrer Aktivität und in ihrer Stabilität unterschiedliche, aber gleichfalls charakteristische Abhängigkeiten von der Salzkonzentration. Alle weiteren untersuchten Enzyme sind nur stabil in Gegenwart von 3 bis 5 M NaCl (19, 23, 25, 30). Für optimale Aktivität sind unterschiedliche Salzkonzentrationen erforderlich. So ist die optimale NaCl-Konzentration für die Isocitrat-Dehydrogenase 0,5 M (22), für die Malat-Dehydrogenase 0,9 M (24)

und für die Alanin-Dehydrogenase 4,3 M (vgl. 8.2.1.1). Halophile Enzyme werden bei der Dialyse gegen Lösung niedriger Ionenstärke meist irreversibel inaktiviert (29, 32). Einige dieser Enzyme lassen sich jedoch durch anschließende Dialyse gegen konzentrierte Salzlösungen wieder reaktivieren (21, 23, 25). Erniedrigen oder Erhöhen der Salzkonzentration sind mit beträchtlichen Konformationsänderungen der zellinneren Makromoleküle verbunden (23, 25, 65). Zur Erklärung dieser salzabhängigen Konformationsänderungen und damit des extrem halophilen Charakters dieser Proteine werden zwei Hypothesen aufgestellt:

Ribosomale Proteine und Membranproteine aus halophilen Bakterien enthalten im Vergleich zu entsprechenden Proteinen anderer Bakterien, die in reiner Form vorliegen, einen großen Überschuß an sauren Aminosäuren (28,29, 32, 58). Durch die hohen Salzkonzentrationen, die für das Erreichen der vollen katalytischen Aktivität benötigt werden, werden die ionisierenden Gruppen zwischen den einzelnen makromolekularen Strukturen abgeschirmt, wobei eine gegenseitige elektrostatische Abstoßung der negativen Ladungen und damit eine Entfaltung der Proteinstruktur und als deren Folge der Verlust der Aktivität verhindert werden. Diese Erklärung läßt sich für das Verhalten von ribosomalen

Proteinen und Membranproteinen anwenden (4, 23, 25). Sie gilt nicht für die einzigen bisher gereinigten extrem halophilen Enzyme, von denen Aminosäure-Analysen vorliegen (DNA-abhängige und RNA-abhängige RNA-Polymerase aus *H. cutirubrum*) (37, 38). Beide haben keinen ungewöhnlich hohen Gehalt an sauren Aminosäuren. Dies ist ebenso wie eine unterschiedliche Abhängigkeit verschiedener halophiler Proteine von Anionen nicht voll mit der oben erwähnten unterschiedlichen Anionen-Ladungsabschirmungshypothese für die Erklärung der Halophilie in Einklang zu bringen (4, 34). Dagegen kommen in Enzymen extrem halophiler Bakterien in großem Umfang hydrophobe Wechselwirkungen vor (30), die in wässrigen Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen durch Aussalz-Effekte stabilisiert werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Reindarstellung und Charakterisierung eines weiteren Enzyms, der Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1) aus *H. salinarium*. Dies Enzym kommt in den genannten Organismen in recht hoher Aktivität vor. Am reinen Enzym wird mit enzymologischen und physikalischen Techniken versucht, Aussagen über die molekulare Basis der Salzabhängigkeit des Enzyms zu erhalten.

II MATERIAL und METHODEN

1. Biologisches Material

1.1. Herkunft der verwendeten Bakterienstämme

Die vorliegenden Untersuchungen werden mit den Bakterienstämmen *Halobacterium salinarium* (ATCC 19700) und *Halobacterium cutirubrum* durchgeführt. *H. cutirubrum* wurde von Professor Dr. A.T. Mathenson, National Research Council of Canada, Division of Biological Sciences, Ottawa, Canada freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.2. Verwendete Nährböden.

1.2.1. Flüssigmedium.

NaCl	250 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 g
KCl	5 g
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2 g
Yeast Extract	10 g
Trypton	2,5 g
H ₂ O ad	1 000 ml

Der pH-Wert des Mediums beträgt 6,5. Salze, Yeast Extract sowie Trypton werden 15 min bei 121° C getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen unmittelbar vor dem Beimpfen der Kulturen gemischt.

1.2.2. Festes Medium.

Agarplatten und Schrägagarröhrchen:

Dem flüssigen Medium (1.2.1.) wird 2,0 % Agar zugesetzt.

2. Behandlung des biologischen Materials.

2.1. Dauerkulturen.

Die Bakterien werden auf Agarplatten und Schrägagarröhrchen (1.2.2.) im Brutschrank bei 37° C angezogen und im Kühlraum bei 4° C aufbewahrt.

Die Inkubationsdauer beträgt 5 Tage. Die Überimpfung auf neue Agarplatten und Kulturröhrchen erfolgt alle acht Wochen. Von den Agarplatten und Schrägagarröhrchen werden vor Gebrauch Subkulturen auf flüssigem Medium (1.2.1.) hergestellt und aus diesen während der logarithmischen Phase die jeweiligen Kulturen beimpft.

2.1.1. Kultur der Bakterien.

Für Wachstumsuntersuchungen werden die Bakterien auf flüssigem Medium gezüchtet. Kulturen mit einem Volumen von 100 ml werden in 500 ml Erlenmeyerkolben bei den angegebenen Temperaturen im Wasserbad geschüttelt. Die Kulturen werden mit 1,0 ml einer ausgewachsenen Kultur beimpft. Zu verschiedenen Zeitabständen werden Proben von 3,0 ml entnommen und deren Extinktion bei 660 nm gegen den Blindwert (nicht beimpftes Medium) im Zeiss PMQ II Spektralphotometer gemessen.

2.1.2. Anzucht der Bakterien zur präparativen Gewinnung von Enzymen.

- a) 20 l Pyrexflaschen, die je 10 l Medium enthalten, werden mit 1 l-Bakterien-Kulturen beimpft. Die Kulturen werden mit sterilisierter Preßluft belüftet. Die Belüftungsrate je Gefäß beträgt ca. 6 l pro min, Temperatur 37°C.
- b) Kulturen mit einem Volumen von 1,5 l Medium werden in 5 l Erlenmeyerkolben mit 150 ml Bakterien-Suspension beimpft und bei 37° C auf einem Reziproschüttler geschüttelt. Die Ernte erfolgt am Ende der logarithmischen Phase, die nach 70 - 72 Stunden erreicht wird, durch Abzentrifugieren in einer WKF- oder SORVALL-Zentrifuge mit Durchflußrotor bei ca. 18.000 x g; Durchflußgeschwindigkeit 4 - 5 l/h. Die Zellen werden anschließend einmal mit Tris-Salz-Puffer (0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl, pH 7,8) gewaschen, abzentrifugiert und bei -20° C eingefroren. Bakterienausbeute 5 - 6 g Feuchtgewicht pro Liter. Der Zusatz von Alanin zum Kulturmedium (1 %), durch das bei *Bacillus subtilis* die Alanin-Dehydrogenase induziert wird (66), hat keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms in den Zellen.

3. Analytisch-chemische Methoden.

3.1. Proteinbestimmung.

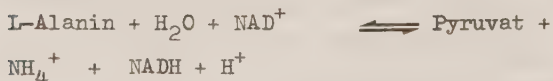
Protein wird mit der FOLIN-Reaktion (39) bestimmt. Als Standard dient eine Lösung von Rinderserumalbumin.

3.2. Messung von Enzymaktivitäten.

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgt im optischen Test nach WARBURG bei 37° C. Gesamtvolumen 3,00 ml; Küvetten 1,00 cm Schichtdicke, Eppendorf-Photometer mit thermostatisiertem Küvettenhalter und W + W - Recorder 4301, Schreiber der Firma Kontron GmbH.

3.2.1. Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1).

Die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase wird in Richtung der reduktiven Aminierung von Pyruvat bestimmt. Die dabei durch die Oxydation von NADH auftretende Extinktionsabnahme wird bei 366 nm gemessen.



Testansatz:

3,5 M NaCl

0,04 M Tris-HCl Puffer, pH 9,0

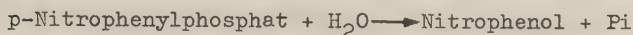
0,014 M Na-Pyruvat

0,0004 M NADH + H⁺

Start der Reaktion mit 0,15 M NH₄Cl

3.2.2. Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1).

Die Bestimmung erfolgt bei 405 nm durch die Messung des bei der Reaktion freigesetzten p-Nitrophenols.



Testansatz:

4,0 M NaCl

0,05 M 4-Nitrophenylphosphat

0,08 M Glycin-Puffer, pH 11,0 (für das Enzym
aus *H. salinarium*)

2,6 M NaCl

0,05 M 4-Nitrophenylphosphat

0,08 M Glycin-Puffer, pH 11,5 (für das Enzym
aus *H. cutirubrum*)

Start der Reaktion mit Enzymprotein.

3.2.3. Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.2).

Die Reaktion wird durch Abfangen des entstehenden Acetaldehyds in Richtung auf die Oxydation des Äthanol gelenkt.



Testansatz:

2,6 M NaCl

0,025 M Tris-HCl, pH 9,5

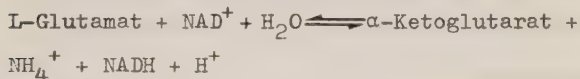
0,025 M Semicarbacid

0,0007 M NADP⁺

Start der Reaktion mit 0,57 M Äthanol.

3.2.4. Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2).

Die Bestimmung basiert auf der Messung der Ex-
tinktionsabnahme des reduzierten NAD bei 366 nm
bei Ablauf der Reaktion von rechts nach links.



Testansatz:

3,5 M NaCl

0,04 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,5 (für das
Enzym aus *H. salinarium*)

3,5 M NaCl

0,04 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 (für das
Enzym aus *H. cutirubrum*)

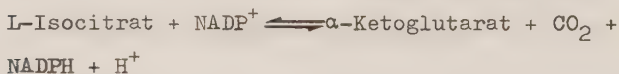
0,01 M Na-Glutamat

0,0015 M NAD^+

Start der Reaktion mit Enzymprotein.

3.2.5. Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42).

Die Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase-Akti-
vität erfolgt nach HUBBARD und MILLER (24).



Testansatz:

0,5 M NaCl

0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 (für das
Enzym aus *H. salinarium*)

0,5 M NaCl

0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 (für das
Enzym aus *H. cutirubrum*)

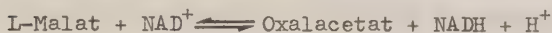
0,00133 M MnCl_2

0,00133 M Na-Isocitrat

Start der Reaktion mit 0,000167 M NADP^+ .

3.2.6. Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37).

Die Bestimmung der Aktivität dieses Enzyms basiert auf dem Test von HOLMES und HALVORSON (22).



Testansatz:

0,9 M NaCl

0,0066 M Na_2HPO_4 , pH 7,2 (für das Enzym
aus *H. salinarium*)

0,9 M NaCl

0,0066 M Na_2HPO_4 , pH 7,5 (für das Enzym aus
H. cutirubrum)

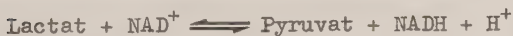
0,0003 M Oxalacetat

0,00095 M NADH_2

Start der Reaktion mit Enzymprotein.

3.2.7. Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27).

Die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase wird durch die Messung der Extinktionsänderung des oxydierten NADH bei 366 nm bestimmt.



Testansatz:

3,5 M NaCl

0,04 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 (für das
Enzym aus *H. salinarium*)

2,6 M NaCl

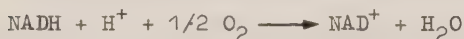
0,04 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 (für das
Enzym aus *H. cutirubrum*)

0,05 M Na-Pyruvat

Start der Reaktion mit 0,0006 M NADH₂.

3.2.8. NADH₂-Oxydase

wird nach der von HOCHSTEIN und DALTON (19) angegebenen Vorschrift bestimmt.



Testansatz:

3,5 M NaCl

0,04 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0

Start der Reaktion mit 0,0006 M NADH₂.

4. Isolierung der Alanin-Dehydrogenase aus *H. salinarium*.

4.1. Zellaufschluß zur Gewinnung des Rohextraktes.

Die eingefrorenen Bakterien werden im Kühlraum bei 4° C aufgetaut. In einem vorgekühlten Mörser von 20 cm Durchmesser werden 50 g Bakterien mit 150 g ALCOA-A 305 verrieben, bis eine feuchte, fadenziehende Paste entsteht. Die Extraktion des Enzyms erfolgt unter Rühren mit 500 ml eines

Puffers von 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl (pH 7,8).

Nach 30 min Zentrifugation bei 16.000 x g wird eine trüb-rote Suspension (Rohextrakt) erhalten.

Die Trübung wird durch die carotinoidhaltigen Purpurfarbstoffe bedingt (22, 24).

4.2. Hitzedenaturierung.

Der Rohextrakt wird mit 14 mM Na-Pyruvat und 1mM EDTA versetzt, in Mengen von je 25,0 ml auf 500 ml Erlenmeyerkolben verteilt und anschließend bei 60°C im Schüttelbad erhitzt. Nach 40 min Schütteln werden die Proben im Eisbad unter Rühren abgekühlt. Die denaturierten Proteine werden durch 30 min Zentrifugieren bei 16.000 x g abgetrennt. Der trüb-rote Überstand enthält die Enzymaktivität.

4.3. Fällung mit verdünnter Essigsäure.

Der trüb-rote Extrakt nach der Hitzedenaturierung (pH 7,8) wird im Eisbad unter Rühren und durch langsames Zutropfen von 1 N Essigsäure auf pH 4,4 eingestellt. Unter Kontrolle des pH-Wertes wird weiter 15 min gerührt; anschließend werden die ausgefallenen Proteine durch 30 min Zentrifugation bei 16.000 x g entfernt. Der Überstand wird weiter durch langsame Zugabe von 1 N Essigsäure auf pH 3,8 eingestellt und nach 15 min Rühren 30 min bei 16.000 x g erneut zentrifugiert. Der Überstand enthält jetzt keine Enzymaktivität mehr und wird verworfen.

Das Sediment, in dem sich die Aktivität befindet, wird in 120 ml eines Puffers, der 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl (pH 7,8) und 10 mM 2-Mercaptoäthanol enthält, gelöst, zuerst 90 min bei 4° C gegen das 100-fache Volumen 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol und danach 16 h bei 30° C gegen das 100-fache Volumen 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl (pH 7,8), + 10 mM 2-Mercaptoäthanol dialysiert.

4.4. Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung.

Die Enzymlösung nach der Säurefällung wird mit einer eisgekühlten gesättigten Ammoniumsulfatlösung (767 g/l), deren pH-Wert mit konzentriertem NH_4OH auf 7,8 eingestellt wird, im Eisbad unter Rühren auf 80 % Sättigung gebracht. Die Zugabe der Ammoniumsulfatlösung erfolgt tropfenweise. Anschließend wird die Enzymsuspension weitere 15 min gerührt und danach 30 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Sediment, das noch eine geringe Aktivität enthält, wird verworfen. Der Überstand, der etwa 90 % der Anfangsaktivität enthält, wird wie unter 4.3. beschrieben, erneut mit 1 N Essigsäure ausgefällt (14).

4.5. Adsorption an Hydroxylapatit (hergestellt nach LEVIN (33)).

10 bis 25 ml einer Hydroxylapatitsuspension in 0,001 M Phosphatpuffer (pH 6,8) werden 5 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Das sedimentierte

Hydroxylapatit wird mit dem gleichen Volumen der Enzymlösung nach der Ammoniumsulfatfraktionierung gemischt und 10 min im Eisbad stehen gelassen. Die Enzym-Hydroxylapatit-Suspension wird dann 10 min bei $11.000 \times g$ zentrifugiert. Das Enzymprotein wird vollständig an das Hydroxylapatit adsorbiert. Das Enzym wird vom Hydroxylapatit mit je 10 bis 25 ml eines $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ - NaCl-Gemisches eluiert. Dieses enthält stets 4,3 M NaCl (pH 7,8) und $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ in steigenden Konzentrationen von 20, 40, 60, 80 und 100 mM.

Die Alanin-Dehydrogenase ist in den Fraktionen mit 40 - 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ enthalten. Diese werden vereinigt und wieder nach 4.3. mit 1 N Essigsäure ausgefällt.

4.6. 1. Chromatographie an Hydroxylapatit.

Hydroxylapatit wird mit 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 4,3 M NaCl-Puffer, pH 7,8 äquilibriert, bis die Hydroxylapatit-Suspension pH 7,8 erreicht hat. Mit der Suspension wird eine Säule (50 x 2,5 cm) gefüllt. Die Säule wird anschließend mit 500 ml des gleichen Puffers gewaschen. Das Enzym wird nach der ersten Hydroxylapatitbehandlung auf die Säule aufgetragen. Es wird mit einem linearen Phosphat-Gradienten eluiert. Die Chromatographie erfolgt bei Zimmertemperatur.

Das Mischgefäß mit Magnetrührer enthält 300 ml 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 4,3 M NaCl (pH 7,8), das Vorratsgefäß 300 ml 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 4,3 M NaCl (pH 7,8). Die Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h wird mit einer peristaltischen Pumpe geregelt. Das Eluat wird über einen UV-Monitor geleitet und in Fraktionen zu 5,0 ml gesammelt. Die aktiven Fraktionen, deren spezifische Aktivität höher liegt als vor der Chromatographie, werden vereinigt und mit 1 N Essigsäure wie unter 4.3. konzentriert.

4.7. 2. Chromatographie an Hydroxylapatit.

Eine mit 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 4,3 M NaCl (pH 6,8) äquilibrierte Hydroxylapatit-Suspension wird in eine Säule (30 x 2,5 cm) gefüllt. Die Säule wird über Nacht mit 500 ml des gleichen Puffers gewaschen. Nach dem Auftragen der Enzymlösung auf die Säule wird mit einem linearen Phosphatpuffer-Gradienten eluiert.

Das Mischgefäß enthält 200 ml 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 4,3 M NaCl (pH 6,8), das Vorratsgefäß 200 ml 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 4,3 M NaCl (pH 6,8). Die Chromatographie erfolgt wieder bei Zimmertemperatur. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 20 ml/h. Proben zu 5,0 ml werden gesammelt und auf ihre enzymatische Aktivität getestet. Alle Proben, die mindestens eine doppelte spezifische Aktivität

gegenüber der aufgetragenen Enzymlösung aufweisen, werden vereinigt. Das Einengen der vereinigten Proben erfolgt mit 1 N Essigsäure wie unter 4.3..

4.8. Chromatographie an DEAE-Cellulose.

DEAE-Cellulose (40 g) wird mit 0,1 N NaOH (1 l) 30 min lang gerührt und darauf mit Wasser neutral gewaschen. Danach wird mit 1 l 0,1 N HCl wieder 30 min gerührt und anschließend mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Für die Chromatographie wird der Austauscher in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) resuspendiert. Feine Partikel, die sich nicht absetzen, werden dekantiert (9). Der so vorbereitete Austauscher wird in eine Säule (15 x 2,5 cm) gefüllt und mit 500 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol zur Stabilisierung des Säulenbettes äquilibriert. Das Enzym, das in 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol vorliegt, wird vor dem Auftragen auf die Säule zur Entfernung der Salze 90 min gegen 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol (100-faches Volumen) bei 4° C dialysiert. Nach der Adsorption der aufgegebenen Enzymlösung wird die Säule mit einem linearen Gradienten von 0,01 M - 2 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 20 ml/h. Es werden Fraktionen von 5 ml gesammelt. Diese werden 16 h gegen das 100-fache

Volumen von 4,3 M NaCl + 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol dialysiert. Danach wird die Aktivität des Enzyms bestimmt. Die Chromatographie erfolgt in diesem Fall bei 4° C.

5. Physiko-chemische Untersuchungen.

5.1. Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird nach MAURER (42) (Gelsystem 1) durchgeführt. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels ist 7 %ig und die des Bisacrylamids 0,2 %ig. Der pH-Wert liegt bei 8,9. Das Sammelgel enthält 2,5 % Acrylamid und 0,65 % Bisacrylamid, bei einem pH-Wert von 6,9. Als Elektrodenpuffer dient ein Tris-Glycin-Puffer von 0,1 M und pH 8,3.

Vor der Durchführung der Elektrophorese werden Enzymlösungen von ca. 50 µg Protein zur Entfernung der hohen NaCl-Konzentration gegen 0,05 M Tris-HCl, (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol dialysiert. Nach der Dialyse werden die Proteinproben aufgetragen und mit dem Tris-Glycin-Puffer sehr vorsichtig überschichtet. Zur Markierung der Front des Elektropherogramms dient Bromphenolblau (1,0 ml einer 1 %igen Lösung zu 1 l Kathodenpuffer). Die Elektrophorese erfolgt bei -2° C und einer Stromstärke von 3 mA pro Röhrchen über 2 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Protein-Banden in den

Gelen 1 h in einem Gemisch von 1 Vol einer 1 %igen wässrigen Coomassie-Brillantblau (R 250) und 19 Vol einer 12,5 %igen Trichloressigsäure gefärbt. Die Entfärbung der Gele geschieht 24 h in einer 10 %igen Trichloressigsäure-Lösung. Anschließend werden die Gele photographisch festgehalten oder densitometrisch im BECKMAN-Spektralphotometer ACTA III ausgewertet.

5.2. Bestimmung der Enzymaktivität an Polyacrylamidgelen.

Eine Proteinlösung von ca. 1 mg wird zu Proben von 50 µg Protein der Disk-Elektrophorese wie unter 5.1. unterworfen. Nach der Lokalisierung der Enzymbande an einem Gel werden von den übrigen Gelen Gelstreifen in der Höhe der Proteinbande geschnitten und mit einem Homogenisator in einem Puffer von 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol zerkleinert. Die homogene Gel-Enzymprotein-Suspension wird 20 min lang bei 48.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen. Der Überstand wird 16 h bei 30° C gegen das 100-fache Volumen einer Pufferlösung von 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol dialysiert. Nach der Dialyse wird die Aktivität des Enzyms bestimmt, die noch etwa 15 % der Anfangsaktivität beträgt.

5.3. Isoelektrische Fokussierung.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt auf der Polyacrylamidgelplatte erfolgt

in einer COLORA-Ultra-Phor-Kammer über 10 h bei 0° C und 10 W. Die Zusammensetzung der benutzten Gel- und Puffersysteme ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Reagenz	%	Zusammensetzung
Acrylamidmonomer- lösung für das Trenngel	6,0	9 g Acrylamid + 0,3 g Bisacrylamid
LKB-Ampholine pH 3,0 bis 8,0	3,0	4,5 ml
N,N,N',N'-Tetra- methylenamid (TEMED)	0,0244	40 ml in 100 ml H ₂ O lösen mit H ₂ O auf 150 ml auffüllen
Ammoniumpersulfat	0,8	120 mg
Elektrodenpuffer:	1. Anodenpuffer 0,2 % NaOH 2. Kathodenpuffer 0,2 % H ₂ SO ₄ + 5 % Saccharose	

Nach Beendigung der elektrophoretischen Prozedur erfolgt der Nachweis der Proteine durch Färbung mit 1 % Coomassie-Blau G 250 in Wasser:Äthanol:Essigsäure (55:40:5) und nachfolgender Entfärbung des Gels in gleicher Lösung ohne Coomassie-Blau. Bei der Färbung der Proteine am Gel und der nachfolgenden Entfärbung des Gels schrumpft das Gel. Der Grad der Schrumpfung wird durch Messung der Länge des Gels vor der Färbung (15,5 cm) und nach der Färbung (13,1 cm) ermittelt. Der Quotient beider Werte ergibt einen Faktor (im vorliegenden Fall 1,183), mit dem die Werte für die Wanderungswege der Proteine multipliziert werden müssen.

5.4. Chromatographie an Sephadex-Gel G-100.

Bestimmung des Molekulargewichts.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase durch Sephadex-Gelchromatographie erfolgt nach der Vorschrift von ANDREWS (1).

5.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Bestimmung des Molekulargewichts.

Das Molekulargewicht der Alanin-Dehydrogenase durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird nach WEBER und OSBORN (62) bestimmt.

5.6. Zirkulardichroismus und optische Rotationsdispersionsmessungen.

Der Zirkulardichroismus und die optische Rotationsdispersion der Alanin-Dehydrogenase werden mittels eines Spektralphotometers (Cary 60) mit CD-Zusatz-ausrüstung der Firma Applied Physics Corp., Monrovia, Calif., gemessen. Die Spektralbreite beträgt 10 Å, die Versuchstemperatur 26° C. Das Gerät wird vor den Messungen mit einer wäßrigen Lösung von d(+)-Campher-10-Sulfonsäure geeicht. Die Schichtdicke der entsprechenden Küvetten beträgt 1 cm. Die molare Elliptizität $[\theta]_{\lambda}$ sowie die molare Drehung $[\alpha]_{\lambda}$ werden für die gesamten CD- und ORD-Kurven nach Abziehen aller Blindwerte durch folgende Gleichungen berechnet.

$$1. [\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda} \cdot Mo}{10 \text{ c.d.}}$$

$$2. [\alpha] = \frac{\alpha \cdot \lambda}{10 \text{ c.d.}}$$

θ_λ = gemessene Elliptizität in Grad

$[\theta]_\lambda$ = molare Elliptizität in Grad cm^2 .
 mol^{-1} bei Wellenlänge λ .

Mo = Durchschnittliches Molekulargewicht eines
Aminosäurerestes in der Alanin-Dehydroge-
nase (Mo = 110).

α_λ = gemessene Drehung in Grad.

$[\alpha]_\lambda$ = spezifische Drehung bei Wellenlänge λ .

c = Proteinkonzentration in g/ml.

d = Schichtdicke der Küvette.

Da Tris-HCl und 2-Mercaptoäthanol die CD- und ORD-Messungen stören, werden alle Enzymlösungen 15 h gegen 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,8) dialysiert. In diesem Fall läßt sich nur eine Reaktivierung von etwa 55 % erreichen. Die Dialyse erfolgt stets gegen das 100-fache Volumen. Die Dialysen zur Inaktivierung und Reaktivierung werden jeweils bei 4° C und 30° C durchgeführt.

a. aktives Enzym: Dialyse gegen 4,3 M NaCl

b. reaktiviertes Enzym: 3,5 ml des aktiven Enzyms

werden zuerst durch 2 h Dialyse gegen 0,1 M NaCl + 10 mM 2-Mercaptoäthanol inaktiviert und anschließend durch 12 h Dialyse gegen 4,3 M NaCl reaktiviert.

- c. inaktiviertes Enzym: (Verdünnung) 3,0 ml des aktiven Enzyms werden durch 12 h Dialyse gegen 0,1 M NaCl inaktiviert.
- d. reaktiviertes Enzym: (Harnstoff) 3,5 ml des aktiven Enzyms werden mit 6 M Harnstoff versetzt und durch Dialyse über 5 h gegen eine Mischung aus 6 M Harnstoff, 0,1 M NaCl und 10 mM 2-Mercaptoäthanol inaktiviert. Die Reaktivierung erfolgt durch 12 h Dialyse gegen 4,3 M NaCl.
- e. inaktiviertes Enzym: (Harnstoff und Verdünnung) 3,0 ml des aktiven Enzyms werden mit 6 M Harnstoff versetzt, 5 h gegen 6 M Harnstoff, 0,1 M NaCl, 10 mM 2-Mercaptoäthanol dialysiert und anschließend durch 12 h Dialyse gegen 0,1 M NaCl inaktiviert.
- f. inaktiviertes Enzym: (Harnstoff) 3,0 ml des aktiven Enzyms werden mit 6 M Harnstoff versetzt und 17 h Dialyse gegen eine Mischung aus 6 M Harnstoff und 0,1 M NaCl inaktiviert.

Nach der Dialyse wird die Aktivität aller Enzyme nach 1-stündiger Zentrifugation bei 48.000 x g bestimmt.

Die Proteinkonzentration der Alanin-Dehydrogenase-Lösung beträgt für CD-Messungen 40 bis 60 µg/ml und für ORD-Messungen 40 bis 120 µg/ml.

5.7. Herkunft der verwendeten Substanzen.

BOEHRINGER, Mannheim:

Chymotrypsinogen, Lactat-Dehydrogenase, Katalase, Ovalbumin, Phosphorylase, Rinderserumalbumin, NAD oxydierte Form, NAD reduzierte Form, NADP oxydierte Form.

DIFCO Laboratories, Detroit, USA:

Yeast Extract, Bacto-Tryptone, Bacto-Agar.

LKB, Bromma, Schweden: Ampholine.

OXOID Ltd., London, England: Yeast Extract.

PHARMACIA fine Chemicals AB., Uppsala, Schweden:

Sephadex G 100, Dextran-Blau 2000.

SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg:

Aluminiumoxydpulver (ALCOA-A 305), DEAE-Cellulose, Coomassie-Brillantblau (R 250) und (G 250), 2-Mercaptoäthanol.

E. MERCK AG, Darmstadt:

Alle übrigen Chemikalien, soweit erhältlich als p.a.-Substanzen.

III ERGEBNISSE

7. Thermotoleranter Charakter extrem halophiler Bakterien.

Für Untersuchungen an extrem halophilen Bakterien sind Kenntnisse über deren Wachstumsphysiologie Voraussetzung. Gut untersucht ist bisher nur deren Salz- und Substratabhängigkeit (12, 29, 31, 32, 48). Genauere Angaben über die Temperaturabhängigkeit fehlen dagegen. Diese wird deshalb für *H. salinarium* und *H. cutirubrum* untersucht. Zellen werden auf Medien 1.2.1. bei steigenden Temperaturen kultiviert.

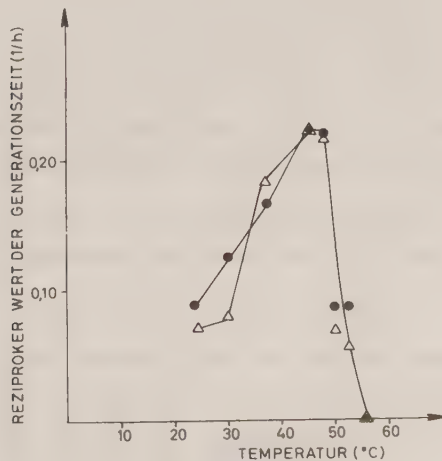


Abb. 1: Temperaturoptimum des Wachstums von Halobakterien: *H. salinarium* ●—●, *H. cutirubrum* ▲—▲. Die reziproken Werte der Generationszeit in der log-Phase sind gegen die Temperatur aufgetragen.

Ihr Wachstum wird durch Trübungsmessungen (2.1.1.) gemessen. Es zeigt sich, daß die Organismen optimal zwischen 45°C und 48°C wachsen. Sie sind damit thermotolerante Organismen (Abb. 1).

7.4. Thermophiler Charakter von Enzymen aus extrem halophilen, thermotoleranten Bakterien.

In den vorhergehenden Experimenten wurde gezeigt, daß *H. salinarium* und *H. cutirubrum* thermotolerant sind. In zellfreien Extrakten (4.1.) von beiden Organismen wird nun die Temperaturabhängigkeit einer Reihe von Enzymen untersucht. Die Aktivitäten werden nach den unter 3.2. beschriebenen Bedingungen unter Einhaltung der optimalen NaCl-Konzentration und des pH-Optimums bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Dabei ergeben sich für alle untersuchten Enzyme bei beiden Organismen Temperaturoptima zwischen 55°C und 65°C (Tabelle 2). Diese Enzyme sind damit in Hinblick auf ihre Aktivität als thermophil anzusehen (55).

8. Reinigung der Alanin-Dehydrogenase aus *H. salinarium*.

Die Alanin-Dehydrogenase findet sich in *H. salinarium* in hoher Aktivität und kann durch einen einfachen optischen Test bestimmt werden. Dies ist eine Voraussetzung für die Reinigung des Enzyms.

Der extrem halophile Charakter des Enzyms erschwert dessen Reinigung, da alle Operationen in Gegenwart von 4,3 M NaCl erfolgen müssen, oder das Enzym durch Dialyse gegen entsprechende Salzlösungen reaktiviert werden muß. Die klassischen Methoden der Enzymreinigung müssen deshalb bei den einzelnen Schritten meist modifiziert werden.

8.1.1. Zellaufschluß zur Gewinnung des Rohextraktes.

Der Aufschluß der Zellen erfolgt durch Verreiben mit Aluminiumoxid, die Extraktion mit einem NaCl-Tris-HCl-Puffer-Gemisch.

8.1.2. Fraktionierte Hitze-Denaturierung.

Der erste Anreicherungsschritt besteht in einer Hitzedenaturierung von inaktiven Proteinen. Es zeigt sich, daß bei einer Inkubation über 40 min bei 60° C und pH 7,8 dieser Schritt besonders wirksam ist. Wesentlich ist für die genaue Einhaltung der Inkubationsdauer und Temperatur ferner, daß die Operation an kleinen Fraktionen ausgeführt wird. Ebenso ist dieser Schritt nur wirksam bei Enzymlösungen mit Proteinkonzentrationen von 5 mg/ml oder höher (Abb. 2 und 3).

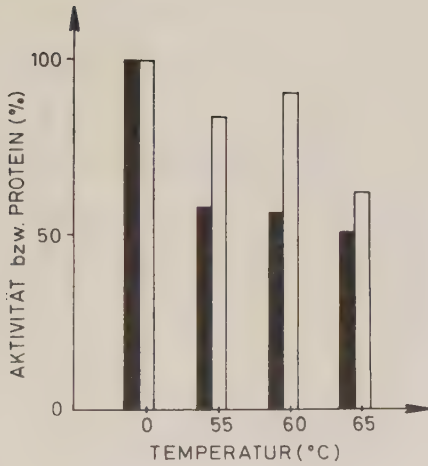


Abb. 2: Hitzestabilität der Alanin-Dehydrogenase.
Die Enzymlösungen werden jeweils 40 min bei
den angegebenen Temperaturen gehalten.
Protein ■, relative Aktivität des Enzyms □,
unbehandelte Kontrolle ○.

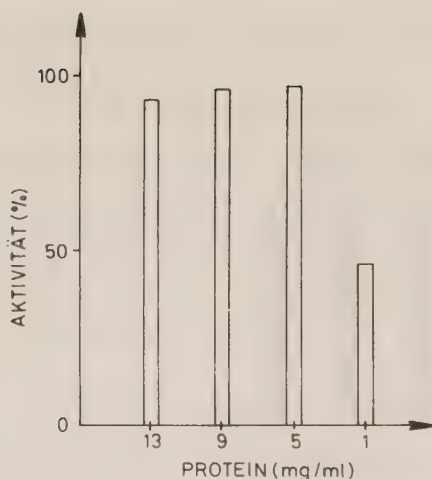


Abb. 3: Hitzestabilität der Alanin-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Enzymlösungen werden 40 min bei 60° C gehalten.

8.1.3. Fällung des Enzyms im sauren pH-Bereich.

Durch Ansäuern mit Essigsäure wird schrittweise Protein ausgefällt. Dabei enthalten die ersten Fraktionen bis pH 4,4 Begleitproteine. Zwischen pH 4,4 und 3,8 präzipitiert dann die Hauptmenge der Enzymaktivität. Diese Fraktion wird in einem Puffer-NaCl-Gemisch aufgenommen, durch Dialyse gegen NaCl-freien Puffer inaktiviert und anschließend durch Dialyse gegen den gleichen Puffer mit

4,3 M NaCl reaktiviert (Abb. 4).

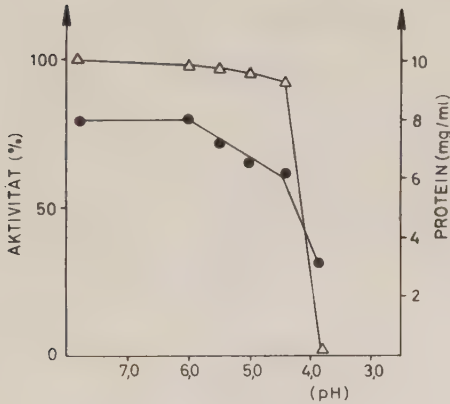


Abb. 4: Fällung der Alanin-Dehydrogenase mit 1 N Essigsäure. Aktivität $\triangle \longrightarrow \triangle$ und Protein $\bullet \longrightarrow \bullet$ im Überstand.

Durch diesen Reinigungsschritt ergibt sich eine gut vierfache Anreicherung. Die Ausbeute von nur 50 % ist nicht sehr befriedigend, konnte jedoch bisher nicht verbessert werden. Durch die gleiche Technik wird auf späteren Stufen der Reinigung das Enzym wiederholt ausgefällt, ohne daß dabei dann noch wesentliche Verluste eintreten.

8.1.4. Saure Ammoniumsulfat-Fraktionierung.

Durch Ammoniumsulfat ist die Alanin-Dehydrogenase aus dem NaCl-Puffer-Gemisch selbst bei einer Sättigung von 80 % nicht ausfällbar (Abb. 5).

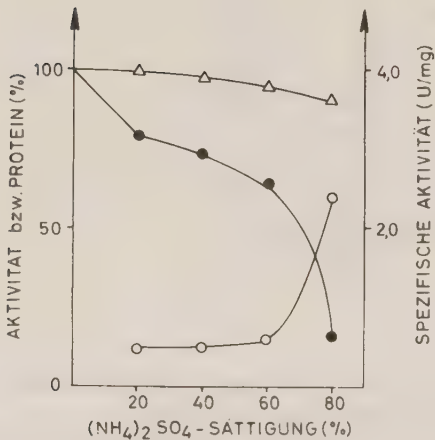


Abb. 5: Fällung der Alanin-Dehydrogenase mit Ammoniumsulfat. Protein ●—●, relative Aktivität ▲—▲ und spezifische Aktivität ○—○ des Enzyms im Überstand.

Dagegen lassen sich durch Ammoniumsulfat bei einer Sättigung bis zu 80 % erhebliche Mengen an Fremdproteinen ausfällen. Aus der mit Ammoniumsulfat zu 80 % gesättigten Lösung kann die Alanin-Dehydrogenase dann durch Ansäuern mit Essigsäure ausgefällt und nachfolgend inaktiviert und

reaktiviert werden. Dieser Schritt führt ohne wesentliche Verluste etwa zu einer Verdoppelung der spezifischen Aktivität.

8.1.5. Adsorption an Hydroxylapatit.

Auch nach den vorangehenden Reinigungsschritten ist die Präparation noch trüb und rötlich gefärbt, was durch den Gehalt an Carotinoiden aus der Purpurmembran bedingt ist. Diese Substanzen lassen sich durch Behandlung mit Hydroxylapatit in einem Batch-Verfahren entfernen.

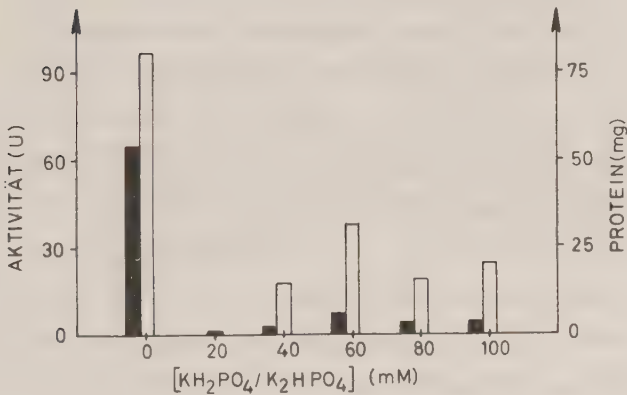


Abb. 6: Adsorption und Elution der Alanin-Dehydrogenase von Hydroxylapatit im Batch-Verfahren. Aktivität $\square$, Protein $\blacksquare$. $\circ$ = Kontrolle ohne Behandlung. Die Säulen geben Enzymaktivität und Protein nach Adsorption und Elution mit den angegebenen Konzentrationen von $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ in 4,3 M NaCl an.

Dabei werden zunächst sowohl Pigmente als auch das Enzym von Hydroxylapatit adsorbiert. Das Enzym kann dann mit Phosphatpuffer schrittweise eluiert werden. Das eluierte Enzym wird wiederum mit Essigsäure ausgefällt, in einem kleinen Volumen Puffer aufgenommen und wie unter 4.3. beschrieben, inaktiviert und reaktiviert. Die resultierende Enzymlösung ist nunmehr farblos und klar. Ein Verlust an Aktivität tritt bei diesem Schritt nicht ein, während die spezifische Aktivität etwa achtfach zunimmt (Abb. 6).

8.1.6. 1. Chromatographie an Hydroxylapatit.

Eine weitere Anreicherung des Enzyms läßt sich durch Chromatographie an Hydroxylapatit bei pH 7,8 erreichen. Auf die Säule wird aktives Enzym in 4,3 M NaCl aufgegeben. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten von 0,05 bis 0,2 M Phosphat pH 7,8, der ebenfalls 4,3 M NaCl enthält. Dadurch behält das Enzym auch während der Chromatographie seine volle Aktivität. Es wird zwischen KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -Konzentrationen von 0,144 und 0,177 M fast quantitativ eluiert. Der Anreicherungsfaktor gegenüber dem vorhergehenden Schritt ist etwa 5 (Abb. 7). Aus den stark verdünnten Fraktionen ist wiederum eine Konzentrierung des Enzyms durch Ausfällen mit Essigsäure und nachfolgender Inaktivierung und Reaktivierung (siehe 4.3.) möglich. Zu beachten ist,

daß dieser sowie auch der nachfolgende Chromatographieschritt bei Zimmertemperatur durchgeführt werden können, da das Enzym in Gegenwart hoher NaCl-Konzentration hinreichend stabil ist.

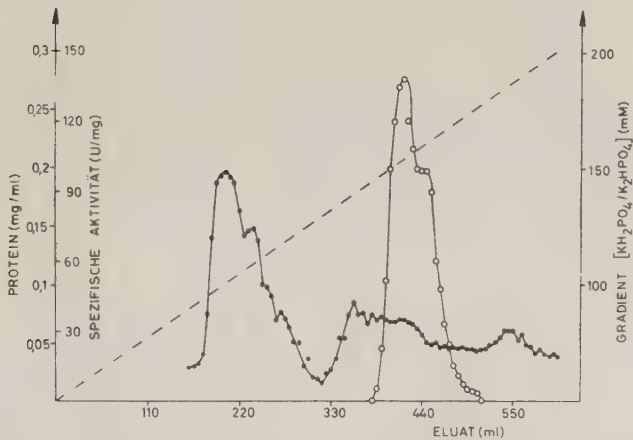


Abb. 7: Auftrennung der Alanin-Dehydrogenase an Hydroxylapatit (pH 7,8). Proteinkonzentration ●—●, spezifische Aktivität ○—○, Gradient Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) - - - - . Einzelheiten siehe Text 8.1.6.).

8.1.7. 2. Chromatographie an Hydroxylapatit.

Durch einen Wechsel des pH-Wertes von 7,8 auf 6,8 ist bei der Wiederholung der Chromatographie an einer kleineren Säule von Hydroxylapatit nochmals eine Verdoppelung der Anreicherung zu erzielen (Abb.8). Die Elution erfolgt wie bei der vorhergehenden Chromatographie. Das Phosphatpuffer-NaCl-Gemisch

gleicher Molarität ist jedoch auf pH 6,8 eingestellt. Die Enzymaktivität wird zwischen Phosphatkonzentrationen von 0,134 M und 0,176 M eluiert.

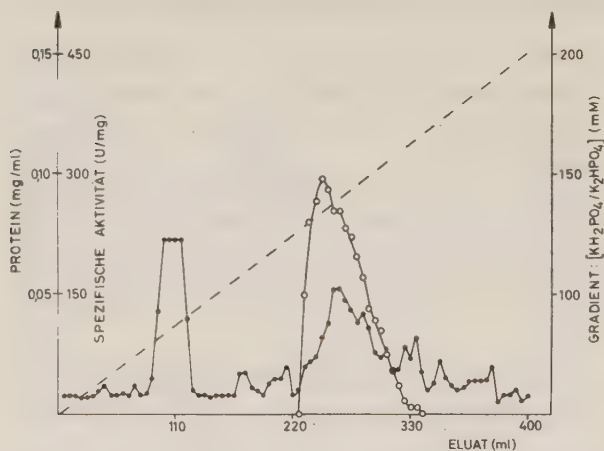


Abb. 8: Chromatographie der Alanin-Dehydrogenase an Hydroxylapatit (pH 6,8). Proteinkonzentration ●—●, spezifische Aktivität ○—○, Gradient Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) - - - . Einzelheiten siehe Text (8.1.7.).

8.1.8. DEAE-Ionenaustauscher-Chromatographie.

Nach der zweiten Chromatographie an Hydroxylapatit zeigen sich bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der Präparation noch geringfügige Nebenbanden. Diese können durch eine Chromatographie an DEAE-Cellulose weiter entfernt werden.

Da die Chromatographie nur in Abwesenheit von Salz möglich ist (9), muß wegen der Labilität des Enzyms

in salzfreien Medien diese Operation im Unterschied zu den anderen Reinigungsschritten in der Kälte bei 4° C durchgeführt werden. Die Elution des Enzyms erfolgt hier mit einem linearen Gradienten von NaCl in 0,05 M Tris-HCl bei pH 7,8. Die Aktivität wird zwischen NaCl-Konzentrationen von 1,74 und 2,00 M eluiert (Abb. 9). Nach dieser Operation ist das Enzym mit einer 800-fachen Anreicherung als weitgehend rein anzusehen (Abb. 10). Die Ausbeute beträgt dabei etwa 20 %.

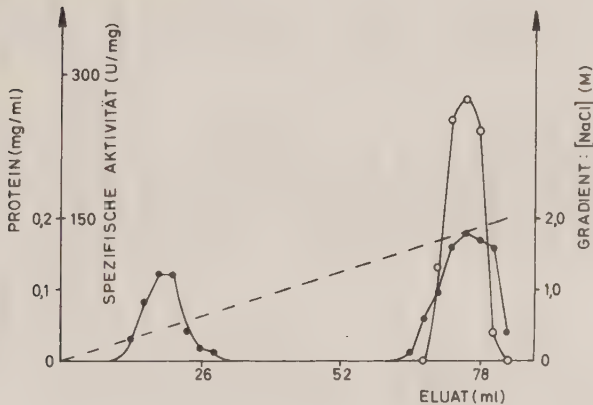


Abb. 9: Chromatographie der Alanin-Dehydrogenase an DEAE-Cellulose. Proteinkonzentration ●—●, spezifische Aktivität ○—○, Gradient Natriumchlorid - - - - . Einzelheiten siehe Text (8.1.8.).



Abb. 10: Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Die Elektrophorese wird bei -2°C für 2 h bei 3 mA/Probe durchgeführt. Die Probe enthält 50 μg Protein.

8.1.9. Übersicht über den gesamten Reinigungsschritt.

Eine Übersicht über den Reinigungsgang der Alanin-Dehydrogenase gibt Tabelle 3. Die Anreicherung des Enzyms durch Hitzedenaturierung, Adsorption an Hydroxylapatit, Hydroxylapatitchromatographie 1 und 2 und Chromatographie an DEAE-Cellulose ist bei einer 20 %igen Ausbeute etwa 800-fach.

Tabelle 3

Reinigung der Alanin-Dehydrogenase

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (Units)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
I. Rohextrakt	500	6650	1900	0,285	100	1
II. Hitze-Denaturierung	430	3870	1680	0,435	88,4	1,6
III. Fällung mit Essig- säure	120	804	930	1,16	50	4,1
IV. Saure - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fraktionierung (80 % Sättigung)	45,5	300	828	2,75	43,6	9,6
V. Adsorptionschromatogra- phie an Hydroxylapatit	13,3	36	822	22,9	43,3	80
VI. Hydroxylapatitsäule 1	85	6,8	780	114,0	41	400
VII. Hydroxylapatitsäule 2	80	3,2	720	225,0	37,9	790
VIII. DEAE-Cellulose	12	2,0	400	200,0	21,0	700

Das gereinigte Enzym zeigt ein einheitliches Verhalten in der isoelektrischen Fokussierung (Abb. 25), SDS-Elektrophorese (Abb. 23) und ist bei der Disk-Elektrophorese auf Polyacrylamidgel frei von Verunreinigungen (Abb. 10).

Die Alanin-Dehydrogenase ist in 0,05 M Tris + 4,3 M NaCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol bei 4° C über zwei Wochen vollständig stabil.

8.2. Eigenschaften der Alanin-Dehydrogenase.

8.2.1. Kinetische Untersuchungen.

8.2.1.1. Einfluß der Natriumchloridkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration ist in Abb. 11 dargestellt. Die Bestimmung erfolgt bei den in der Abbildung angegebenen effektiven Salzkonzentrationen im Testansatz mit einem durch Dialyse gegen 4,3 M NaCl voll aktivierten Enzym. Die lineare Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wird dabei im optischen Test (3.2.1.) über 2 min verfolgt. Es ergibt sich eine sigmoide Abhängigkeit.

Zu beachten ist, daß dieser Kurvenverlauf nicht identisch ist mit dem Verlauf der Kurven bei der wesentlich langsamer eintretenden Reaktivierung des Enzyms durch wechselnde NaCl-Konzentrationen (siehe 8.2.5.2.).

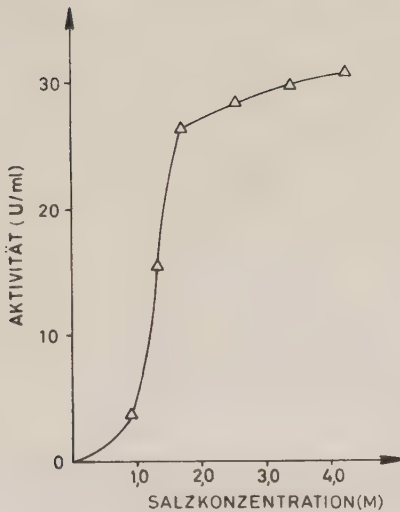


Abb. 11: Abhängigkeit der Aktivität der Alanin-Dehydrogenase von der NaCl-Konzentration.

8.2.1.2. Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit wird im optischen Test (3.2.1.) bei 3,5 M Natriumchlorid ermittelt. Das pH-Optimum für die reduktive Aminierung von Pyruvat zu Alanin liegt bei pH 9,0 recht deutlich im alkalischen Bereich. Das Enzym ähnelt in dieser Eigenschaft der Alanin-Dehydrogenase aus *B. subtilis* (66), die ein pH-Optimum bei

pH 8,8 für diese Reaktion hat (Abb. 12).

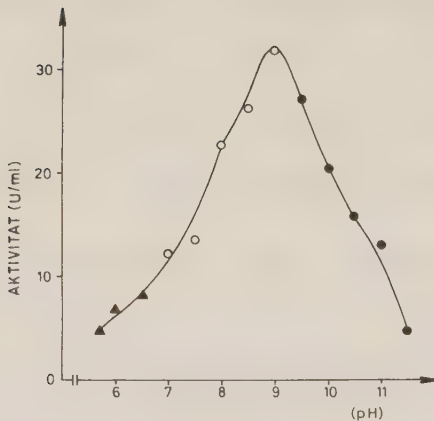


Abb. 12: pH-Abhängigkeit der Aktivität der Alanin-Dehydrogenase.
Tris-HCl, pH 7,0 bis 9,0 ○—○, KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 5,7 bis 6,5 ▲—▲, Glycine/NaOH pH 9,5 bis 11,5 ●—●.
Die Pufferkonzentration beträgt im Testansatz jeweils 43 mM.

8.2.1.3. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Im Standardansatz für die Bestimmung der Enzymaktivität in Gegenwart von 3,5 M NaCl, KCl und NaNO₃ werden bei wechselnden Konzentrationen an NADH, Pyruvat und NH₄Cl die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion ermittelt (Abb. 13, 14 und 15).

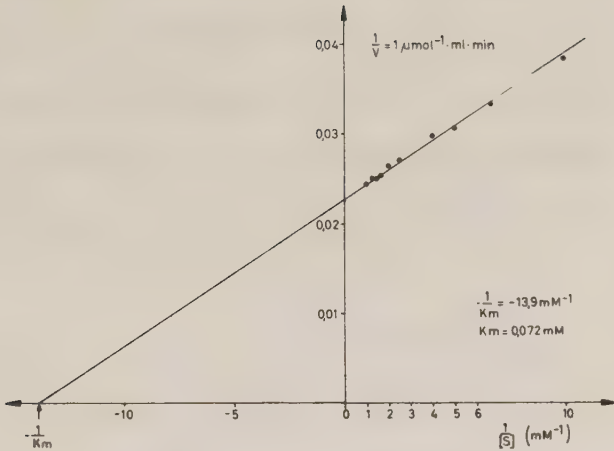


Abb. 13: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Alanin-Dehydrogenase von der NADH-Konzentration in 3,5 M NaCl. Darstellung nach LINEWEAVER und BURK.

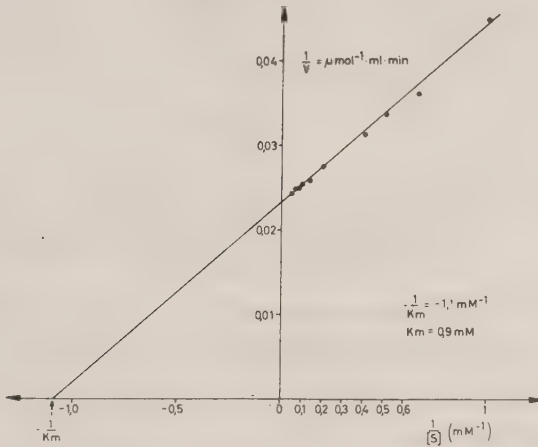


Abb. 14: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Alanin-Dehydrogenase von der Pyruvat-Konzentration in 3,5 M NaCl. Darstellung nach LINEWEAVER und BURK.

Aus diesen werden in der Auswertung nach LINEWEAVER und BURK (35) die MICHAELIS-Konstanten ermittelt (Tabelle 4). Es zeigt sich, daß in Gegenwart von 3,5 M NaCl oder 3,5 M KCl keine großen Unterschiede in den MICHAELIS-Konstanten auftreten. In Gegenwart der gleichen Konzentration von NaNO_3 liegen die K_m -Werte dagegen um eine halbe bis eine Zehnerpotenz höher.

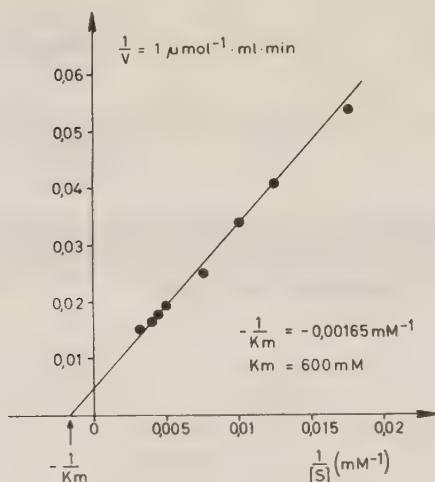


Abb. 15: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Alanin-Dehydrogenase von der NH_4Cl -Konzentration in 3,5 M NaCl. Darstellung nach LINEWEAVER und BURK.

8.2.1.4. Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

In vorangehenden Experimenten wurde bereits der thermophile Charakter zahlreicher halophiler Enzyme beschrieben (7.1.). Für die Alanin-Dehydrogenase aus *H. salinarium* gibt Abbildung 16 noch weitere Daten über die Temperaturabhängigkeit des Enzyms.

Tabelle 4

Michaelis-Konstanten der Alanin-Dehydrogenase
bei pH 7,8 und 37° C

Salz 3,5 M	K _m	
	NADH (M)	Pyruvat (M)
NaCl	$7,2 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-4}$
KCl	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$
NaNO ₃	$5,26 \cdot 10^{-4}$	$4,67 \cdot 10^{-3}$

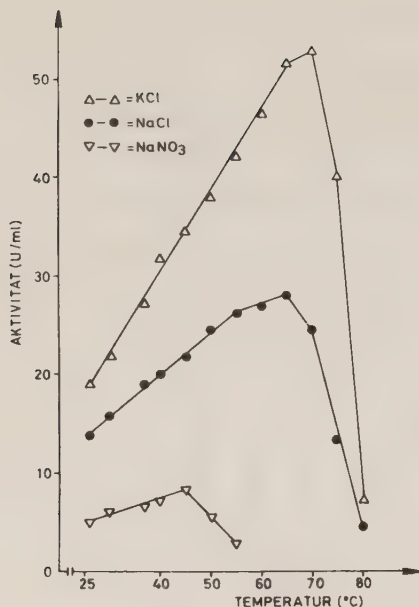


Abb. 16: Temperaturabhängigkeit der Alanin-Dehydrogenase in Gegenwart verschiedener Salze.

Es zeigt sich, daß das Enzym in Gegenwart von 3,5 M NaCl ein Temperaturoptimum bei 65° C hat; in Gegenwart von 3,5 M KCl liegt es bei 70° C. Diese Temperaturoptima liegen über dem Temperaturoptimum für das Wachstum (45° C - 48° C) (siehe Ergebnisse 7.). Auffällig ist auch, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von KCl mit steigender Temperatur rascher zunimmt als in Gegenwart von NaCl.

Aus den Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Temperaturen lassen sich die Aktivierungsenergien

durch Auftragen des Logarithmus der Maximalgeschwindigkeit gegen die reziproke Temperatur (ARRHENIUS-Auftragung) graphisch ermitteln (Abb. 17).

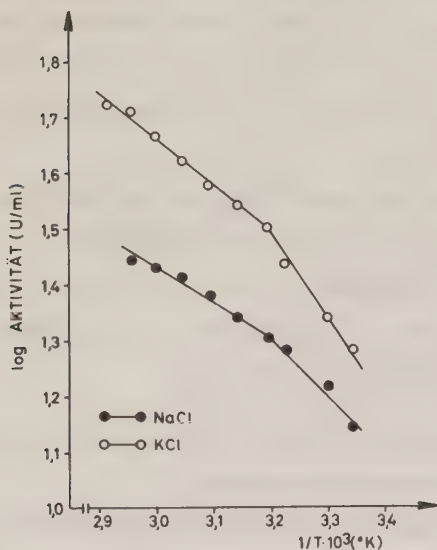


Abb. 17: ARRHENIUS-Diagramm zur Ermittlung der Aktivierungsenergie der Alanin-Dehydrogenase. Die einzelnen Meßwerte sind der Abb. 15 entnommen.

Dabei ergeben sich für die Reaktion folgende Aktivierungsenergien:

Temperaturbereich

	26° C - 40° C	40° C - 65° C
in 3,5 M NaCl	4,3 Kcal.Mol ⁻¹	2,2 Kcal.Mol ⁻¹
	26° C - 40° C	40° C - 70° C
in 3,5 M KCl	6,2 Kcal.Mol ⁻¹	3,0 Kcal.Mol ⁻¹

Hervorzuheben ist, daß sich in der graphischen Auswertung eine Änderung der Steigung ergibt. Daraus lassen sich für die Temperaturbereiche von 26°C bis 40°C sowie von 40°C bis 65°C bzw. 40°C bis 70°C unterschiedliche Aktivierungsenergien bestimmen. In beiden Temperaturbereichen ist die Aktivierungsenergie in Gegenwart von NaCl geringer als in Gegenwart von KCl.

Ein gebrochener Arrhenius-Plot ist in ähnlicher Weise auch bereits bei anderen thermophilen bzw. thermostabilen Enzymen (55, 63) beschrieben worden. Dieses Verhalten wird später noch weiter diskutiert (siehe Diskussion).

8.2.1.5. Einfluß von einwertigen und zweiwertigen Kationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Verschiedene monovalente und divalente Kationen haben unterschiedliche Effekte auf die Aktivität des Enzyms (Abb. 18).

In Gegenwart von höheren Konzentrationen (etwa ab 2 M) von NaCl, KCl, RbCl und CsCl werden annähernd gleiche Maximalgeschwindigkeiten erreicht. Bei geringen Konzentrationen zeigt das Enzym in Gegenwart von RbCl eine mehrfach höhere Aktivität als in Gegenwart der gleichen Konzentration von NaCl, KCl und CsCl. LiCl ist dagegen wesentlich weniger wirksam. In Konzentrationen von mehr als 2 M denaturiert es dazu das Protein.

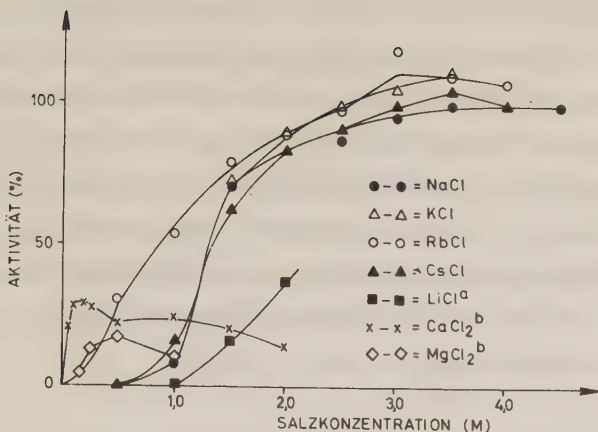


Abb. 18: Die Geschwindigkeit der Alanin-Dehydrogenase-Reaktion als Funktion der Konzentration an ein- und zweiwertigen Kationen.
a = führt zum Ausfall des Proteins
b = in höheren Konzentrationen nicht mehr löslich.

Erdalkalichloride (MgCl_2 und CaCl_2) aktivieren das Enzym nur in sehr geringen Konzentrationen und verursachen in höheren Konzentrationen eine deutliche Hemmung der Aktivität. Die aktivierenden Konzentrationen an MgCl_2 liegen im Bereich der Mg^{++} -Konzentration, die für optimales Wachstum der Organismen erforderlich ist (siehe Einleitung).

Im Gegensatz zu Beobachtungen an anderen extrem halophilen Enzymen vermögen die Erdalkalichloride damit bei der Alanin-Dehydrogenase die für volle Aktivität notwendigen hohen Konzentrationen an einwertigen Kationen nicht zu ersetzen (18).

3.2.1.6. Einfluß von Anionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase wird durch die Anionen verschiedener Na-Salze noch wesentlich stärker beeinflusst als durch unterschiedliche Kationen. Die höchste Aktivität des Enzyms wird in Gegenwart von NaCl beobachtet. Na_2SO_4 aktiviert das Enzym geringfügig im Konzentrationsbereich von 0,5 - 1,0 M, höhere Konzentrationen sind kaum noch löslich und hemmen bereits (Abb. 19).

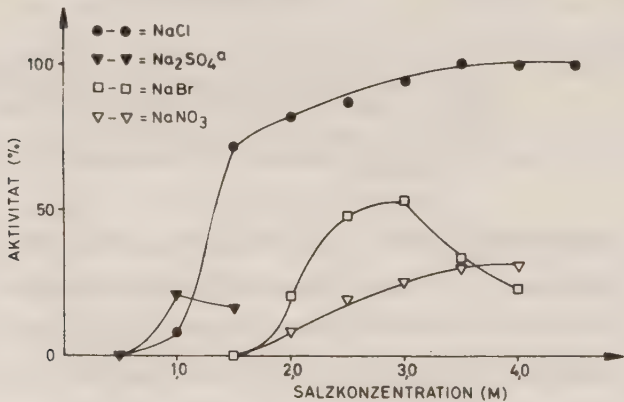


Abb. 19: Einfluß von Anionen auf die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase.
a = in höheren Konzentrationen nicht mehr löslich.

In Gegenwart von Natriumbromid und Natriumnitrat ist das Enzym gleichfalls aktiv. Die für das Auftreten einer meßbaren Aktivität erforderlichen Konzentrationen an diesen beiden Salzen sind jedoch um

1 M höher als die entsprechenden Konzentrationen an Natriumchlorid bzw. Natriumsulfat. Die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms bleibt auch bei den höheren Konzentrationen an Natriumnitrat oder Natriumbromid hinter der Maximalgeschwindigkeit in Gegenwart der gleichen Konzentration an Natriumchlorid zurück. Höhere Konzentrationen (mehr als 3,0 M) von Natriumbromid führen wieder zu einer Verringerung der Aktivität.

Die Daten für F^- , J^- , ClO_4^- und SCN^- sind in Abb. 19 nicht wiedergegeben. Anstelle von Cl^- verhindern diese Anionen jegliche Aktivität des Enzyms.

8.2.2. UV-Spektrum.

Das gereinigte Enzym nach der Chromatographie an DEAE-Cellulose (vgl. Abb. 9 unter 8.1.8.) zeigt ein charakteristisches Proteinspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient E_{280}/E_{260} beträgt dabei 1,5 (Abb. 20).

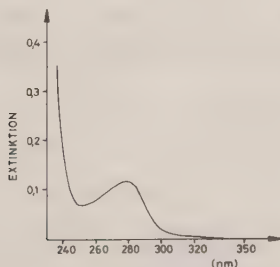


Abb. 20: UV-Absorptionsspektrum der Alanin-Dehydrogenase. Die Aufnahme des Spektrums erfolgt in 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl-Puffer (pH 7,8) bei 25° C. Proteinkonzentration 0,09 mg/ml.

8.2.3. Molekulargewichtsbestimmungen.

8.2.3.1. Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase durch Sephadex-Gel-Filtration.

Eine Säule von Sephadex-Gel G-100 (2,5 x 60 cm) wird zunächst durch Waschen mit 800 ml 0,05 M Tris-HCl + 4,3 M NaCl (pH 7,8) äquilibriert und dann mit Dextranblau 2000 sowie Rinderserumalbumin, Ovalbumin und Chymotrypsinogen als Standardproteinen geeicht (Abb. 21).

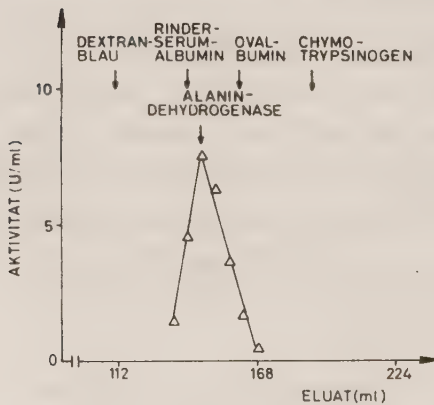


Abb. 21: Chromatographie der Alanin-Dehydrogenase an Sephadex G-100 zur Molekulargewichtsbestimmung.

Das Ausschlußvolumen V_o (bestimmt durch die Elution von Dextranblau 2000) beträgt 110 ml. Für die Standardproteine ergeben sich die folgenden Elutionsvolumina (V_e):

	V_e	MG
Rinderserumalbumin:	140 ml	67 000
Ovalbumin:	160 ml	45 000
Chymotrypsinogen:	190 ml	25 000

Nachfolgend wird unter gleichen Bedingungen die Alanin-Dehydrogenase filtriert. Das Elutionsvolumen des Enzyms liegt bei 145 ml.

Aus den beiden Größen V_e und V_o kann nach einem empirisch ermittelten Zusammenhang das scheinbare Molekulargewicht von globulären Proteinen berechnet werden (1, 8).

Es gilt die Beziehung:

$$\log \text{Molekulargewicht} = \frac{V_e}{V_o}$$

Diese Beziehung liegt auch der graphischen Auswertung durch das Einsetzen der im Experiment ermittelten Werte für V_e und V_o in diese Gleichung, die in Abb. 22 gegeben ist, zugrunde.

Durch die graphische Interpolation erhält man für die Alanin-Dehydrogenase ein Molekulargewicht von etwa 60.000. Eine Wiederholung der Filtration der gleichen Enzymprobe nach vorheriger Konzentrierung des Eluates mittels Amicon-Filter (PM10) führt zu

dem völlig gleichen Ergebnis.

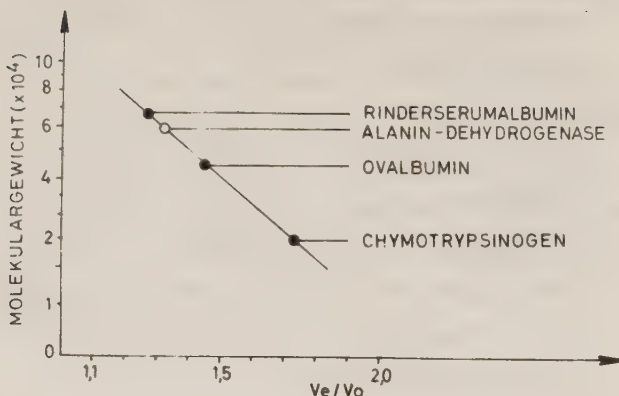


Abb. 22: Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase durch Chromatographie an Sephadex G-100. Auswertung von Abb. 21.

8.2.3.2. Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase durch SDS-Elektrophorese.

Eine weitere einfach auszuführende Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes von globulären Proteinen ist die Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Anwesenheit von Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS). Diese von SHAPIRO et al. (53) beschriebene Methode basiert auf dem Zusammenhang zwischen der relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit eines Protein-SDS-Komplexes in einem Polyacrylamid-Gel und dem Molekulargewicht des Proteins. Dabei ist unter Standardbedingungen die Wanderungsge-

schwindigkeit der einzelnen Proteine dem Logarithmus des Molekulargewichtes proportional (62).

Es gilt die Beziehung:

$$R_f = \frac{W_p}{W_F}$$

wobei R_f die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins, W_p der Wanderungsweg des Proteins und W_F der Wanderungsweg der Front ist. Die Elektrophorese erfolgt über 3 h bei Zimmertemperatur und 8 mA pro Gel. Die Eichung erfolgt mit einer Untereinheit der Glycogenphosphorylase aus Kaninchenmuskel (MG = 100.000) und der Lactat-Dehydrogenase (MG = 36.000) sowie Rinderserumalbumin (MG = 67.000) und Ovalbumin (MG = 45.000).

Der Elektrophorese unterworfen werden jeweils 5 µg der Eichproteine sowie 10 µg der Alanin-Dehydrogenase. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die Front der Bromphenolblau-Bande mit Tusche markiert. Anschließend werden die Gele gefärbt und nach der Entfärbung die Lage der Banden densitometrisch bestimmt. Abb. 23 zeigt die densitometrische Auswertung des Gels für die Alanin-Dehydrogenase.

Die bekannten Molekulargewichte der Eichproteine werden auf halblogarithmischem Papier gegen die R_f -Werte aufgetragen. Durch graphische Interpolation läßt sich über den R_f -Wert der Alanin-Dehydrogenase dann deren Molekulargewicht ermitteln (Abb.24). Hierbei

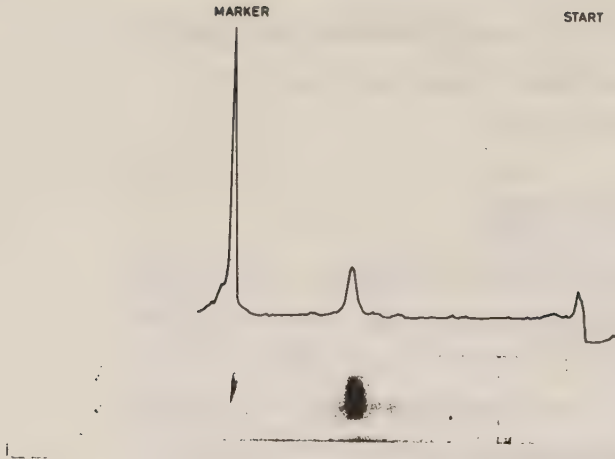


Abb. 23: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Alanin-Dehydrogenase. Proteinkonzentration 10 μg , Laufzeit 3 h bei 8 mA pro Säule. Die Elektrophorese wird bei Zimmertemperatur durchgeführt.

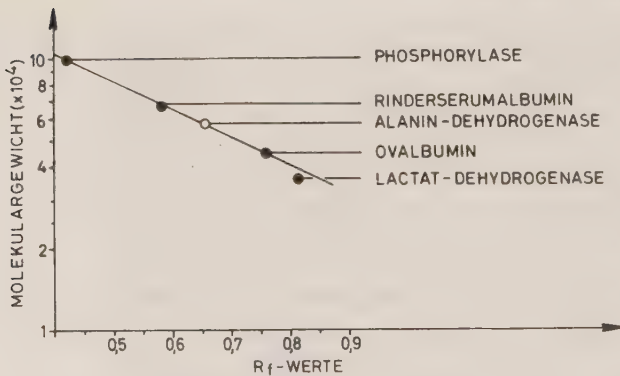


Abb. 24: Bestimmung des Molekulargewichtes der Alanin-Dehydrogenase in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

ergibt sich ein Wert von 58.000. Dieser ist 3,3 % niedriger als der durch Gel-Filtration ermittelte Wert (60.000). Dieser Unterschied liegt innerhalb der Meßgenauigkeit beider Methoden, die zwischen 5 und 10 % liegt.

8.2.4. Bestimmung des isoelektrischen Punktes.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Alanin-Dehydrogenase erfolgt durch Fokussierung des Proteins in einem pH-Gradienten. Dieser Gradient wird durch Elektrophorese eines Ampholine-Gemisches hergestellt. Als Trägermaterial dient dabei ein 6,0 %iges Polyacrylamidgel. Das Protein wird in dem pH-Bereich des Gradienten konzentriert, der seinem isoelektrischen Punkt entspricht. Es bilden sich Proteinbanden, deren Breite durch die fokussierende Wirkung des elektrischen Feldes und die Diffusion bestimmt ist (64).

Abb. 25 zeigt das Verhalten der Alanin-Dehydrogenase in der Elektrofokussierung. Als Vergleichssubstanzen werden neben dem Enzym, Katalase (IP 5,8), Rinderserumalbumin (IP 4,9) und Ovalbumin (IP 4,7) aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei 0° C und 10 Watt an einer Polyacrylamidgelplatte (pH-Gradient 3,0 - 8,0) über 10 h.

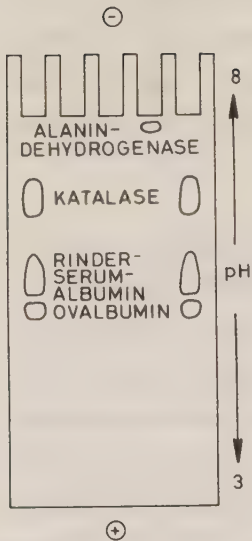


Abb. 25: Isoelektrische Fokussierung der Alanin-Dehydrogenase und einiger Eichproteine.

Der pH-Gradient im Gel wird experimentell durch Zerschneiden eines Gel-Streifens in 0,5 cm breite Segmente und Bestimmung des pH-Wertes in den einzelnen Segmenten überprüft. Das Ergebnis zeigt Abb. 26.

Aus der angefärbten Platte werden die Wanderungswege der einzelnen Proteine entnommen und in den pH-Gradienten eingetragen. An der Kurve des pH-Gradienten läßt sich dann aus der Wanderung des unbekannten Proteins dessen IP ablesen.

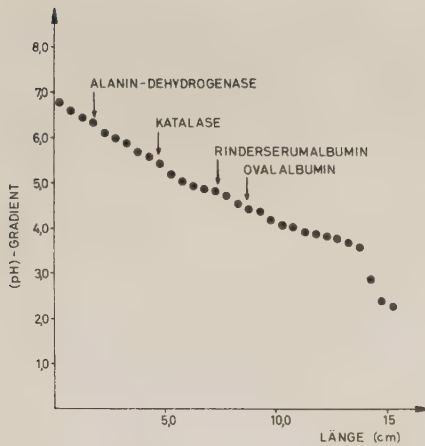


Abb. 26: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Alanin-Dehydrogenase durch Elektrofokussierung mit Ampholine (pH-Gradient 3,0 - 8,0) in 6 % Polyacrylamidgel.

Bei den als Vergleichssubstanzen eingesetzten Proteinen ergibt sich eine vollständige Übereinstimmung der erhaltenen IP-Werte mit den für diese Substanzen bekannten Werten. Für die Alanin-Dehydrogenase ergibt sich durch Extrapolation ein Wert von 6,3 für den isoelektrischen Punkt.

8.2.5. Inaktivierung und Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase durch Wechsel der Salzkonzentration.

Wie bereits mehrfach erwähnt, geht die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase bei Verringerung der Salzkonzentration verloren. Den zeitlichen Verlauf dieser Inaktivierung (ausgelöst durch Dialyse gegen

0,05 M Tris-HCl bei pH 7,8 + 10 mM 2-Mercaptoäthanol und 4° C) zeigt Abb. 27. Nach 90 min Dialyse ist praktisch keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

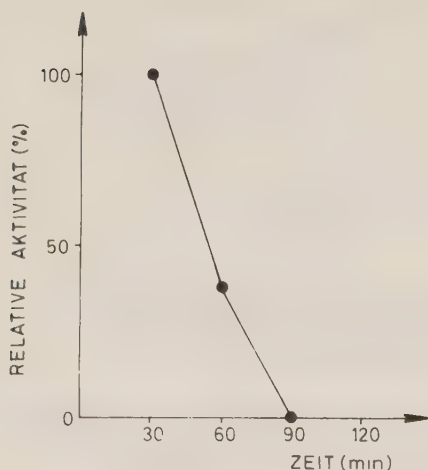


Abb. 27: Zeitabhängigkeit der Inaktivierung der Alanin-Dehydrogenase durch Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) + 10 mM 2-Mercaptoäthanol.

Eine Dialyse des Enzyms gegen 4,3 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl bei pH 7,8 und 10 mM 2-Mercaptoäthanol und 30° C führt zu einer zeitabhängigen Reaktivierung des Enzyms. Dabei werden nach 16 h Dialyse 100 % der Ausgangsaktivität erreicht. Damit ist eine vollständige Inaktivierung des Enzyms bei Salzentzug

und eine vollständige Reaktivierung durch Salzzugabe möglich. Zu beachten ist jedoch, daß die Reaktivierung wesentlich langsamer erfolgt als die Inaktivierung (Abb. 28).

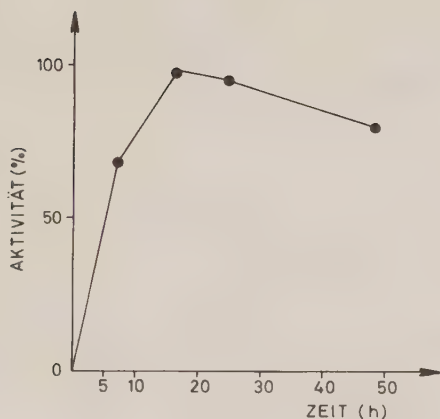


Abb. 28: Zeitabhängigkeit der Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase. Bedingungen wie in Tabelle 5.

Die Reaktivierung zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und von der Temperatur. Die Reaktivierung erfolgt optimal bei pH 7,8 und einer Temperatur von 30° C (Abb. 29, 30).

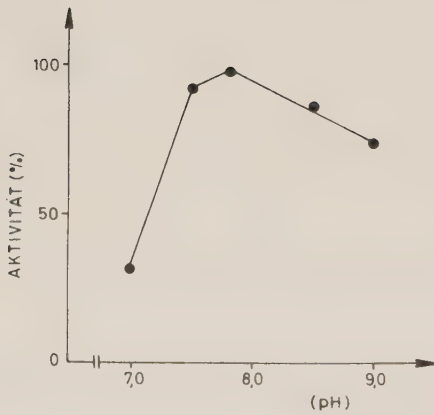


Abb. 29: pH-Abhängigkeit der Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase. Bedingungen wie in Tabelle 5.

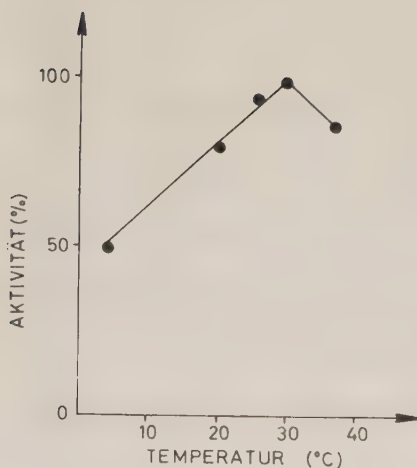


Abb. 30: Temperaturabhängigkeit der Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase. Bedingungen wie in Tabelle 5.

8.2.5.1. Die Bedeutung von SH-Gruppen für die reversible Inaktivierung der Alanin-Dehydrogenase.

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß sowohl die Inaktivierung als auch die Reaktivierung von SH-Gruppen abhängig ist. Inaktivierung und nachfolgende Reaktivierung in Abwesenheit von 2-Mercaptoäthanol ergibt eine Aktivität von weniger als 10 %, während die Durchführung beider Schritte in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol 100 % der Anfangsaktivität ergibt.

Tabelle 5 Inaktivierung und Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase

Bedingungen der Inaktivierung und Reaktivierung	Spezifische Aktivität nach Reaktivierung %
-ME	9
+ME	68
-ME	91
+ME	100
+ME, +Harnstoff	87
+ME, +Harnstoff	54

ME = 2-Mercaptoäthanol

Das Enzym wird in Abwesenheit oder in Gegenwart von 10 mM 2-Mercaptoäthanol oder 10 mM 2-Mercaptoäthanol und 6 M Harnstoff inaktiviert und in Abwesenheit von Harnstoff reaktiviert.

Eine Inaktivierung in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol und eine nachfolgende Reaktivierung ohne 2-Mercaptoäthanol führt im Endresultat zu einer geringeren Aktivität als der Ablauf beider Vorgänge unter umgekehrten Bedingungen (Inaktivierung ohne 2-Mercaptoäthanol, Reaktivierung in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol). Wird die Inaktivierung unter Standardbedingungen, aber mit Zusatz von 6 M Harnstoff durchgeführt, so erhält man nach Reaktivierung in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol noch 87 % der Ausgangsaktivität. Dieser Wert sinkt auf 54 %, wenn die Reaktivierung ohne 2-Mercaptoäthanol durchgeführt wird.

8.2.5.2. Salzabhängige Hysterese der Alanin-Dehydrogenase.

Ein besonders interessantes Verhalten zeigt das Enzym bei aufeinanderfolgender Aktivierung und Inaktivierung. Zunächst werden Proben des völlig inaktivierten Enzyms über 14 h bei 30° C und pH 7,8 (0,05 M Tris-HCl + 10 mM 2-Mercaptoäthanol) gegen steigende Konzentrationen von NaCl dialysiert. Bis zu einer Salzkonzentration von 2,5 M NaCl ist das Enzym noch inaktiv; bei 3,0 M NaCl wird eine Reaktivierung von 71 % und bei 3,5 M NaCl von 87 % erzielt. Salzkonzentrationen von 4,0 bzw. 4,3 M NaCl führen zu 100 % der ursprünglichen Aktivität.

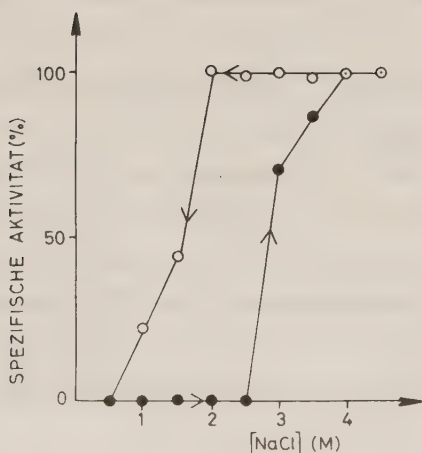


Abb. 31: Salzabhängige Hysterese der Alanin-Dehydrogenase.
Inaktiviertes Enzym wird 14 h bei 30° C und pH 7,8 (0,05 M Tris-HCl + 10 mM 2-Mercapto-
äthanol) gegen steigende Konzentrationen von NaCl dialysiert ●—●. Aktives Enzym wird unter gleichen Bedingungen gegen abnehmende Konzentrationen von NaCl dialysiert ○—○.

Eine Dialyse des vollständig aktivierten unter völlig gleichen Bedingungen bei fallenden Konzentrationen von NaCl ist herunter bis zu einer Konzentration von 2,0 M völlig ohne Effekt. Bei geringeren Salzkonzentrationen fällt die Aktivität des Enzyms dann rasch ab. Bei 1,5 M NaCl sind noch 45 %, bei 1,0 M 22 % und bei 0,5 M NaCl keine meßbaren Aktivitäten mehr vorhanden (Abb. 31).

Dieser Vorgang, bestehend aus dem Wechsel von Aktivierung und vollständiger Inaktivierung läßt sich ohne nennenswerte Aktivitätseinbußen mehrfach wiederholen. Das Enzym zeigt dabei ein Verhalten, das als Hysteresese definiert ist (45). Das Enzym wird von einem Zustand in einen weiteren überführt und von diesem wieder in den Ausgangszustand. Der Weg, den das Enzym dabei in der ersten Umwandlung nimmt, ist nicht identisch mit dem Weg, über den es in den Ausgangszustand zurückkehrt. Eine Deutung dieses Phänomens wird später gegeben (s. Diskussion).

8.2.5.3. Nachweis von Veränderungen der Sekundärstruktur der Alanin-Dehydrogenase durch Zirkulardichroismus und optische Rotationsdispersion.¹⁾

Die Chiralität von Peptiden und Proteinen wird nicht nur durch die asymmetrischen C-Atome der einzelnen Aminosäuren, sondern auch durch die räumliche Anordnung der Peptidkette bedingt. Daraus ergibt sich, daß umgekehrt auch Änderungen der räumlichen Anordnung eines Polypeptides zu einer Änderung der Chiralität führen können. Die vorhergehenden Experimente über die reversible Inaktivierung der Alanin-Dehydrogenase durch Wechsel der Salzkonzentrationen lassen erwarten, daß diese Vorgänge mit Änderungen

¹⁾ Für die Anleitung zur Durchführung der CD- und ORD-Messungen sowie für die Unterstützung bei der Auswertung der Daten darf der Verfasser Herrn Dr. D. Jeckel (Abteilung für Chemie der Ruhr-Universität Bochum) danken.

der Raumstruktur (= Konformation) der Enzymmoleküle verknüpft sind.

Chirale Substanzen sind Enantiomere, die mit ihrem Spiegelbild nicht zur Deckung gebracht werden können. Sie sind optisch aktiv, d.h. sie drehen beim Durchgang linear polarisierten Lichtes dessen Schwingungsebene - die Polarisationssebene - um einen bestimmten Betrag. Diese Erscheinung wird dadurch erklärt, daß das linear polarisierte Licht aus zwei Komponenten, aus links und rechts zirkularpolarisierten Lichtstrahlen zusammengesetzt ist, deren elektrische Vektoren sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das chirale Medium fortpflanzen. Dadurch wird eine Drehung der Polarisationssebene um einen Winkel α bewirkt. Die Drehung wird mit abnehmenden Wellenlängen verstärkt. Das optische Drehvermögen, nämlich der spezifische Drehwert $[\alpha]$ oder der molare Drehwert $[\eta]$ einer optisch aktiven Substanz ist von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes abhängig. Dieses Phänomen, von BIOT 1817 entdeckt, wird optische Rotationsdispersion - ORD - genannt. Dieser Zusammenhang läßt sich quantitativ durch die DRUDE-Gleichung formulieren:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{A}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)}$$

$[\alpha]_{\lambda}$ = spezifische Drehung bei Wellenlänge λ .

A = Für bestimmte Meßbedingungen charakteristische Konstante.

λ = Wellenlänge (nm).

λ_c = Wellenlänge der dominierenden Absorptionsbande (210 nm für Proteine) .

Besitzt das chirale Medium zusätzlich im Meßbereich eine Absorptionsbande (bedingt durch ein optisch aktives Chromophor), so werden die links und rechts zirkularpolarisierten Lichtstrahlen unterschiedlich stark absorbiert.

Beim Austritt aus dem chiralen Medium beschreibt die Spitze der Summe der Vektoren eine Ellipse, und der Lichtstrahl ist elliptisch polarisiert. Die Hauptachse der Ellipse schließt mit der Ausgangslage den Drehwinkel α ein. Diese Erscheinung, die nur im Absorptionsbereich eines aktiven Chromophoren auftritt, wird als Zirkulardichroismus - CD - bezeichnet.

Beim Durchstrahlen einer absorbierenden Substanz mit polarisiertem Licht wird die ORD-Kurve in ihrem Absorptionsbereich um einen wellenförmigen Anteil überlagert, der nach ihrem Entdecker als COTTON-Effekt bezeichnet wird. Im Idealfall weisen die

gemessenen Kurven einen "Gipfel" und ein "Tal" auf. Liegt der "Gipfel" bei längeren Wellenlängen als das "Tal", ist der COTTON-Effekt positiv, liegt er bei niedrigeren Wellenlängen, ist er negativ (56). Je nach positiver oder negativer Grund-ORD sind vier Typen eines COTTON-Effektes möglich (56).

Die CD- und ORD-Kurven eines Proteins sind einmal von seiner Aminosäure-Zusammensetzung bzw. aromatischen Chromophoren, und zum anderen von seiner Konformation abhängig. Obwohl es bisher noch keine allgemein und gültig formulierten Beziehungen zwischen Zirkulardichroismus, optischer Rotationsdispersion und der Konformation eines Makromoleküls gibt, so ermöglichen diese Messungen doch die Ermittlung von Unterschieden in der Konformation hochmolekularer, optisch aktiver Moleküle (6, 52).

Bei den Proteinen sind im wesentlichen drei Grundtypen der Konformation zu unterscheiden:

Die α -Helikale Struktur, die Faltblatt- oder β -Struktur sowie die "ungeordnete bzw. Rest-Struktur" (durch das Symbol ρ ausgedrückt), die weder zur α - noch zur β -Struktur sich zuordnen läßt und früher im Angelsächsischen häufig nicht ganz korrekt als "Random Coil" bezeichnet wurde. Bei den Molekülen mit "ungeordneter Konformation" liegen Peptidketten vor, die fest zueinander fixiert sind und

dadurch COTTON-Effekte hervorrufen können (51, 52). Nach CHEN et al. (6) sowie nach SAXENA und WETLAUFER (52) lassen sich die prozentualen Anteile an α -, β - und ρ -Struktur in Proteinen aus deren CD-Spektren errechnen.

An der Alanin-Dehydrogenase aus *H. salinarium* werden CD- und ORD-Messungen in verschiedenen, durch wechselnde Salzkonzentrationen eingestellten Aktivitätszuständen durchgeführt. Abb. 32 zeigt zunächst die CD-Spektren.

Das aktive Enzym (a), das reaktivierte Enzym inaktiviert nach Salzentzug (b) und das nach Harnstoffbehandlung reaktivierte Enzym (d) zeigen im fernen UV-Bereich zwei Banden mit negativer Elliptizität, deren Minima bei 208 und 220 nm liegen. Die Elliptizität der Bande bei 208 nm ist dabei wesentlich größer als die der Bande bei 220 nm. Beide Banden sind charakteristisch für helikale Proteine (6, 13). Die CD-Spektren der in unterschiedlicher Weise denaturierten Alanin-Dehydrogenase (c, e, f) stimmen mit den CD-Spektren von Modellsubstanzen für die "ungeordnete Konformation" ("Reststruktur") vollständig überein (6, 13). Damit zeigt sich, daß in den inaktivierten Formen des Enzyms der Anteil an helikalen Strukturen im Vergleich zu den aktiven Formen des Enzyms verringert ist.

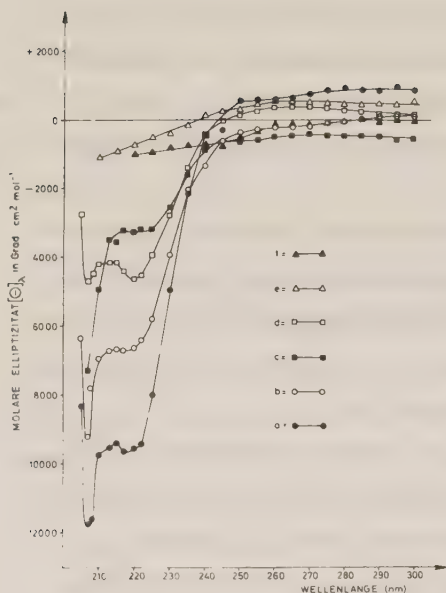


Abb. 32: CD-Spektren der Alanin-Dehydrogenase bei verschiedenen Aktivitätszuständen: aktives Enzym (a), reaktiviertes Enzym (b), reaktiviertes Enzym nach vorheriger Harnstoffbehandlung (d), inaktiviertes Enzym (c), inaktiviertes Enzym nach vorheriger Harnstoffbehandlung (e) und inaktiviertes Enzym in Gegenwart von Harnstoff (f). Die Proteinkonzentration beträgt 40 - 60 µg/ml. (Einzelheiten siehe Text 8.2.5.3. und Material und Methoden unter 5.6.).

Diese Beobachtungen werden nachfolgend quantitativ ausgewertet. Dabei werden die einzelnen Strukturanteile des Enzymproteins in den verschiedenen Zuständen nach einem Verfahren von SAXENA und WETLAUFER (52) bzw. CHEN et al. (6) errechnet.

Der Beitrag der am Proteinaufbau beteiligten Strukturen (α -Helix, β - und ρ -Struktur) zur gemessenen molaren Elliptizität ($[\theta]$) wird durch Lösen der folgenden Gleichung erhalten:

$$1. [\theta]_{\lambda_1} = [\theta^H]_{\lambda_1} \cdot x^H + [\theta^\beta]_{\lambda_1} \cdot x^\beta + [\theta^R]_{\lambda_1} \cdot x^R$$

$$2. [\theta]_{\lambda_2} = [\theta^H]_{\lambda_2} \cdot x^H + [\theta^\beta]_{\lambda_2} \cdot x^\beta + [\theta^R]_{\lambda_2} \cdot x^R$$

$$3. 1 = x^H + x^\beta + x^R$$

wobei: $[\theta]_{\lambda_1} \dots [\theta]_{\lambda_n}$ gemessene molare Elliptizität bei verschiedenen Wellenlängen λ .

$[\theta^H]_{\lambda_1} \dots [\theta^H]_{\lambda_n}^*$ molare Elliptizität für 100 % α -Helix-Struktur bei verschiedenen Wellenlängen λ .

$[\theta^\beta]_{\lambda_1} \dots [\theta^\beta]_{\lambda_n}^*$ molare Elliptizität für 100 % β -Struktur bei verschiedenen Wellenlängen λ .

$[\theta^R]_{\lambda_1} \dots [\theta^R]_{\lambda_n}^*$ molare Elliptizität für 100 % ρ -Struktur bei verschiedenen Wellenlängen λ .

Dabei ist: x^H = α -Helixanteil

x^β = β -Strukturanteil

x^R = Reststrukturanteil

Die Summe der Strukturanteile ist gleich 1.

Die Lösung der Gleichungen für die Berechnung der Strukturanteile erfolgt mit Hilfe eines Tischcomputers (Olivetti Programma 101). Bei der Berechnung werden alle gemessenen $[\theta]_\lambda$ -Werte untereinander kombiniert. Die angegebenen Anteile stellen das

* Die entsprechenden Werte sind aus der Arbeit von CHEN et al (6) übernommen.

arithmetische Mittel aus allen berechneten Wertkombinationen dar. Durch Einsetzen der errechneten Strukturanteile in Gleichung (1) oder (2) werden die Ergebnisse überprüft. In Abbildung 33 sind die für die Alanin-Dehydrogenase errechneten und experimentell ermittelten CD-Kurven dargestellt.

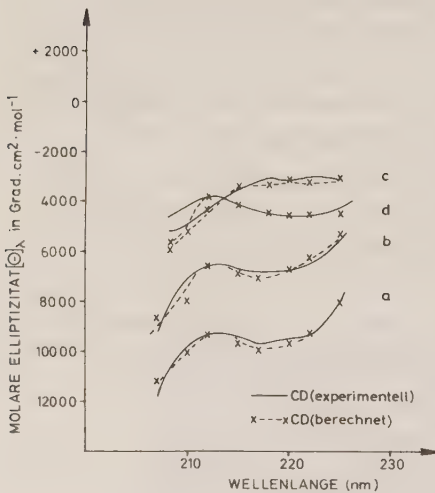


Abb. 33: Vergleich der gemessenen und der berechneten molaren Elliptizität $[\theta]_{\lambda}$ (zwischen 225 - 208 nm) der Alanin-Dehydrogenase.

Die Kurven stimmen recht gut für den Spektralbereich zwischen 225 und 210 nm. Unterhalb von 210 nm treten dagegen besonders bei den reaktivierten Enzymen (Kurve 33 b bzw. 33 d) Abweichungen auf,

deren Deutung bisher nicht möglich ist. Die Abweichung zwischen errechneten und gemessenen $[\Theta]$ - Werten betragen jedoch in keinem Fall in den untersuchten Spektralbereichen mehr als 5 %.

In der Tabelle 6 sind die ausgewerteten prozentualen Anteile an α -Helix, β -Struktur und ρ -Struktur, die aus den gemessenen $[\Theta]$ - Werten der Abbildung 32 in Kombination mit den von CHEN (6) berechneten Werten für $[\Theta^H]$, $[\Theta^\beta]$ und $[\Theta^R]$ wiedergegeben. Aus diesen Ergebnissen ist deutlich eine Änderung der räumlichen Anordnung der Polypeptidkette des Enzymmoleküls in An- und Abwesenheit von NaCl festzustellen. Das aktive Enzym in 4,3 M NaCl enthält 23 % α -Helix, 25 % β -Struktur und 52 % ρ -Reststruktur. Durch die Inaktivierung geht die α -Struktur fast vollständig, die β -Struktur um die Hälfte verloren; entsprechend steigt der Anteil der ρ -Struktur an.

Aus methodischen Gründen (siehe Material und Methoden, 5.6.) ist in diesem Experiment keine vollständige Reaktivierung erreichbar. An einem zu 55 % reaktiviertem Enzym ist jedoch bereits eine wesentliche Erhöhung der geordneten Strukturanteile erkennbar. Am auffälligsten ist der Gehalt an β -Struktur. Dieser beträgt wie beim aktiven Enzym etwa 25 %. Der Gehalt an α -Struktur steigt wieder auf 12 % an. Die ρ -Struktur beträgt noch 63 %.

Tabelle 6 Prozentuale Anteile der α -Helix, β -Struktur und Reststruktur der Alanin-Dehydrogenase, berechnet aus den CD-Spektren zwischen 225 und 208 nm

<u>Protein</u>	%	%	%	%	%
Alanin-Dehydrogenase ^{a)}	α -Helix	β -Struktur	Reststruktur	der relativen Aktivität	α -Helix/ relative Aktivität
aktives Enzym in 4,3 M NaCl	22,6	24,8	52,6	100	0,226
inaktiviertes Enzym in 0,1 M NaCl	1,2	12,2	86,6	0	-
reaktiviertes Enzym in 4,3 M NaCl	12,3	24,5	63,4	55	0,224
reaktiviertes Enzym in 4,3 M NaCl nach 5 h Harnstoffbehandlung	6,1	8,1	85,8	27	0,226
inaktiviertes Enzym in 0,1 M NaCl nach 5 h Harnstoffbehandlung	0	0	100	0	-
inaktiviertes Enzym in 6 M Harnstoff und 0,1 M NaCl	0	0	100	0	-

a) Einzelheiten (siehe Text 8.2.5.3.), (Material und Methoden, 5.6.).

Nach einer Harnstoffbehandlung reaktiviertes Enzym, dessen Aktivität noch 27 % beträgt, hat noch 6,1 % α -Struktur, 8,1 % β -Struktur und 86 % ρ -Struktur. Durch Salzentzug und Harnstoffbehandlung denaturiertes Enzym enthält weder α -Helix noch β -Struktur.

Bemerkenswert ist, daß sich aus diesen Daten ein strikter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an α -Helix und Aktivität ergibt. Der Quotient % α -Helix / % relative Aktivität ist vollständig konstant.

Abbildung 34 zeigt die ORD-Spektren des Enzyms in verschiedenen Aktivitätszuständen von:

a) aktivem Enzym, b) reaktiviertem Enzym, d) reaktiviertem Enzym nach vorheriger Harnstoffbehandlung und f) inaktiviertem Enzym in Gegenwart von Harnstoff.

Die höchste spezifische Drehung bei 232 nm zeigt das native Enzym in 4,3 M NaCl (Kurve 34 a).

Reaktivierte Proben des Enzyms (Kurve 34 b und d) zeigen in Übereinstimmung mit den CD-Messungen (Abb. 32) entsprechend ihrer geringeren Aktivität auch eine geringere spezifische Drehung bei 232 nm (vgl. Tabelle 6). Dieses Verhalten der aktiven Enzymproben in Abhängigkeit von der Wellenlänge (Minimum bei 232 nm) deutet ebenfalls auf das Vorhandensein von α -helikalen Strukturen hin (13).

Denaturiertes Enzym (Kurve 34 f) zeigt keine spe-

zifische Drehung mehr. Es ergibt sich damit wiederum ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Enzyms und der spezifischen Drehung in den ORD-Spektren. Eine genaue quantitative Auswertung dieses Zusammenhanges setzt noch weitere experimentelle Untersuchungen voraus.

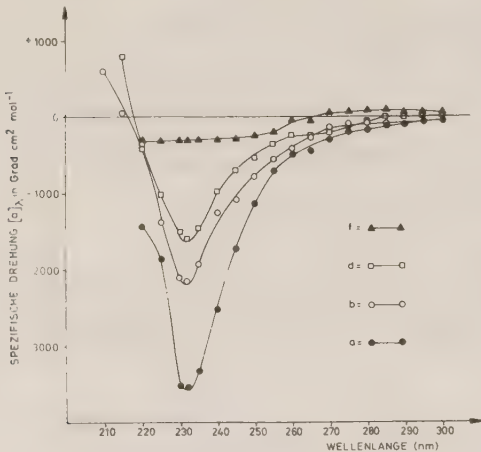


Abb. 34: ORD-Spektren der Alanin-Dehydrogenase verschiedenen Aktivitätszuständen. aktives Enzym (a), reaktiviertes Enzym (b), reaktiviertes Enzym nach vorheriger Harnstoffbehandlung (d) und inaktiviertes Enzym in Gegenwart von Harnstoff (f). Die Proteinkonzentration beträgt 40 - 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (Einzelheiten siehe Text 8.2.5.3. und in Material und Methoden 5.6.).

VI DISKUSSION

Extrem halophile Bakterien sind eine Gruppe von Mikroorganismen, die in Gewässern mit extrem hoher Salzkonzentration (bis zu 25 % NaCl), z.B. im Großen Salzsee und Toten Meer vorkommen (31). Salzseen finden wir vor allem in wärmeren Regionen. Dies bedingt bereits durch hohe Sonneneinstrahlung eine erhöhte Temperatur des Wassers. Der hohe Salzgehalt des Wassers ist weiterhin Ursache für eine nur geringe Durchmischung des Wassers in diesen Seen durch Strömungsvorgänge. Dadurch kommt es in der oberen Schicht noch zusätzlich zu einem Wärmestau.

In Seen mit 23 - 24 % NaCl wurden deshalb Durchschnittstemperaturen von 56° C und in einzelnen Fällen Temperaturanstiege bis auf 71° C gemessen (36). Berücksichtigt man diese Temperaturverhältnisse, so ist zu erwarten, daß die extrem halophilen Bakterien auch einen erheblichen Grad von Thermotoleranz bzw. Thermophilie zeigen. Dies ist tatsächlich der Fall (siehe Ergebnisse 7).

Die in den vorliegenden Experimenten untersuchten zwei wichtigsten Vertreter extrem halophiler Bakterien (*H. salinarium* und *H. cutirubrum*) wachsen in einem Temperaturbereich von 24° C bis 52° C, wobei das Optimum zwischen 45° C und 48° C liegt (Abb. 1).

Ab 55° C wurde kein Wachstum mehr beobachtet.

Die ermittelten Temperaturoptima liegen höher als die in BERGEY'S MANUAL (5) angegebenen Werte (40° C), wobei der Art des verwendeten Kochsalzes (Salinensalz u.a.) eine entscheidende Bedeutung für das Wachstum zuzuschreiben ist (17).

Die Ermittlung der Temperaturoptima von acht verschiedenen Enzymen unter optimalen Reaktionsbedingungen aus *H. salinarium* und aus *H. cutirubrum* ergibt, daß in allen Fällen die Temperaturoptima über 55° C, in den meisten Fällen sogar über 60° C liegen (Tabelle 2).

Damit sind diese Enzyme aus den extrem halophilen, thermotoleranten Mikroorganismen als thermophil anzusehen. In ähnlicher Weise zeigt die Nitratreduktase aus einem nicht weiter charakterisierten Stamm von Halobakterium thermophilen Charakter (41).

Neben diesen thermophilen Enzymen gibt es in den Zellen wahrscheinlich andere Enzyme oder Zellbausteine, die bei diesen hohen Temperaturen bereits inaktiviert werden und dadurch das niedrigere Temperaturoptimum für das Wachstum der intakten Zellen bedingen.

Für eingehendere Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen der Halophilie, Thermophilie und der Proteinkonformation wurde die Alanin-Dehydrogenase

ausgewählt. Von den untersuchten Enzymen (Tabelle 2) zeigt dieses eine besonders extreme Halophilie. Das Enzym aus beiden Stämmen zeigt die höchste Aktivität bei einer NaCl-Konzentration von 4,3 M und 65° C. Im Vergleich dazu zeigen die Isocitrat-Dehydrogenase (24) mit einem Aktivitätsoptimum bei 0,5 M NaCl und die Malat-Dehydrogenase (22) mit einem Aktivitätsoptimum bei 0,9 M NaCl eine wesentlich geringere Halophilie. Wie die Alanin-Dehydrogenase können auch die Malat-Dehydrogenase (23) und die Isocitrat-Dehydrogenase (25) durch Salzentzug reversibel inaktiviert werden. Dies ist jedoch nicht als charakteristische Eigenschaft aller halophilen Enzyme anzusehen. In zahlreichen Fällen gelingt die Reaktivierung durch Dialyse gegen Salzlösung nicht (23, 25, 32).

Die vollständig reversible Inaktivierung der Alanin-Dehydrogenase und eine relativ hohe Aktivität der Enzyme in Zellen von *H. salinarium* sind als günstige Voraussetzung für die Reinigung des Enzyms anzusehen.

Es wird durch Hitze-Denaturierung, Fällung mit Essigsäure, saure Ammoniumsulfatfraktionierung, Adsorption an Hydroxylapatit, Hydroxylapatit-Chromatographie 1+2) und Ionenaustauscherchromatographie etwa 800-fach angereichert. Die Ausbeute beträgt etwa 20 %.

Die größten Aktivitätsverluste treten bei der ersten Fällung mit Essigsäure und bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose auf. Dabei ist auffallend, daß nach der ersten Säurefällung keine weiteren Verluste durch Fällung des Enzyms bei pH 3,8 auftreten, obgleich dieser Schritt mehrfach zur Konzentrierung angewandt wird. Bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose gehen etwa 50 % der eingesetzten Aktivität verloren.

Erschwert wird die Reinigung durch die extreme Salzabhängigkeit des Enzyms. Diese bedingt, daß entweder alle Reinigungsschritte in Gegenwart von mindestens 4 M NaCl erfolgen müssen oder, daß das Enzym nach jedem Schritt vollständig inaktiviert und reaktiviert werden muß. Eine Stabilisierung des Enzyms durch Substrate, Coenzyme oder Cofaktoren, wie dies für die Malat-Dehydrogenase (23), die Isocitrat-Dehydrogenase (25) und NADH-Dehydrogenase aus halophilen Bakterien (20) beschrieben wurde, gelingt nicht.

Die Präparation nach der Chromatographie an DEAE-Cellulose erweist sich in der analytischen Disk-Elektrophorese (Abb. 9) und isoelektrischen Fokussierung (Abb. 25) mit einem IP-Punkt von 6,3 als weitgehend homogen. Molekulargewichtsbestimmungen des nativen Enzyms werden durch Gel-Filtration nach

ANDREWS (1) und des denaturierten Enzyms durch SDS-Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese nach WEBER und OSBORN (62) durchgeführt. Bei der Gel-Filtration ergibt sich ein Molekulargewicht von 60.000 für das aktive Enzym und in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese ein Wert von etwa 58.000 für das denaturierte Enzym.

Die gute Übereinstimmung des Molekulargewichts des nativen und denaturierten Enzyms zeigt, daß die native Alanin-Dehydrogenase nicht aus trennbaren Untereinheiten besteht.

Das Enzym aus *H. salinarium* unterscheidet sich damit wesentlich von dem gleichen Enzym aus *B. subtilis*, das ein Molekulargewicht von 228.000 hat und aus 4 Untereinheiten besteht (66):

Für die Aktivität des Enzyms kann NaCl durch eine Reihe von anderen Salzen ganz oder teilweise ersetzt werden (Abb. 18).

Die beobachtete stimulierende Wirkung von hohen Konzentrationen an Alkalichloriden auf die Aktivität in der Reihenfolge $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ sowie der Erdalkalichloriden von $\text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++}$ bei niedrigen Konzentrationen steht in guter Übereinstimmung mit der Hypothese, daß durch die Salze die intramolekularen elektrostatischen Ladungen des Enzymmoleküls neutralisiert werden. Damit wird eine

gegenseitige elektrostatische Abstoßung der negativen Ladungen der Polypeptidkette, die zu deren Entfaltung führt, verhindert (4, 23, 25). Das Enzym behält infolge dessen eine stabile Struktur und bleibt deshalb aktiv.

Schwierigkeiten bereitet es aber, die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Kationen auf die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase über den Ionenradius oder über die ionische Mobilität nach der Theorie von EVANS und SORGER (10) zu erklären.

Denn obwohl Na^+ und K^+ im Vergleich zu Li^+ einfache ionische Radii und Rb^+ und Cs^+ nahezu identische Radii zu Mg^{++} besitzen, zeigen sie einen unterschiedlichen Effekt auf die enzymatische Aktivität.

Noch komplexer als die Wirkung verschiedener Kationen ist die Wirkung wechselnder Anionen. Eine volle Aktivität ist nur in Gegenwart von Cl^- vorhanden; geringere Aktivierungen bewirken NO_3^- , SO_4^{--} und Br^- , während andere (ClO_4^- , SCN^- , J^-) zu einer vollständigen Inaktivierung führen (Abb. 19). NO_3^- führt zu einer Senkung des Temperaturoptimums von etwa 20°C (Abb. 16) und gleichzeitig zu einer Verringerung der Affinität des Enzyms zu seinen Substraten (Tabelle 4). Fast alle Beobachtungen stehen jedoch im Einklang mit den Vorstellungen von HATEFI und HANSTEIN (15), bzw. LANYI und STEVENSON (30), über den Einsalzeffekt von Anionen auf Proteine.

Danach wird die Aktivität und Stabilität von Proteinen durch Anionen etwa in einer Reihenfolge $\text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ beeinflusst.

Hohe Konzentrationen von NaCl und ähnlich wirkenden Salzen, die die Löslichkeit organischer Moleküle in Wasser verringern, erhöhen die Stabilität von Proteinmolekülen. Dies erfolgt über einen "Aussalzeffekt", durch den apolare Gruppen in das Innere des Makromoleküls gedrängt werden und dadurch in diesem Bereich eine Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkungen verursachen. Substanzen mit entgegengesetzter Wirkung (z.B. SCN^- und ClO_4^-) dagegen führen zu einem "Einsalzeffekt", bei dem die Zahl der hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren des Proteins verringert wird, was einen Verlust an Stabilität zur Folge hat (16, 44, 50, 54).

Im vorliegenden Fall läßt sich die Verschiebung des Temperaturoptimums von 65°C auf 45°C (Abb. 16) und die Erniedrigung der Affinität des Enzyms zu seinen Substraten (Tabelle 4) in Gegenwart von 3,5 M NaNO_3 , das einen erheblichen "Einsaleffekt" hat (15), in dieser Weise deuten. In ähnlicher Weise ist an der Threonin-Desaminase aus *H. cutirubrum* eine Kältesensibilität in Gegenwart von 5 M NaCl beobachtet und interpretiert worden.

Insgesamt läßt die Abhängigkeit der Alanin-Dehydrogenase und anderer halophiler Enzyme von den verschiedenen Anionen und Kationen in wechselnden Konzentrationen und bei verschiedenen Temperaturen sowohl auf einen stabilisierenden Effekt der Aufhebung von elektrostatischen Kräften durch bestimmte Kationen als auch auf Veränderungen der Zahl oder der Stärke von hydrophoben Wechselwirkungen schließen (30, 34).

Die salzabhängige Inaktivierung und Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase (Tabelle 5) ist an die Gegenwart von SH-Gruppen gebunden. Das gilt im besonderen Maße für die Reaktivierung, die vollständig nur in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol oder Dithioerythrit verläuft. Nach Alkylierung oder Oxydierung von SH-Gruppen ist keine Reaktivierung mehr möglich (26).

Wird die Salzkonzentration durch Dialyse bei 4° C gegen das 100-fache Volumen einer Puffer-Lösung in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol erniedrigt, so wird das Enzym innerhalb von 90 min vollständig inaktiviert (vgl. Abb. 27). Durch langsame Steigerung der Natriumchlorid-Konzentration auf über 4 M kann die Alanin-Dehydrogenase vollständig reaktiviert werden. Dies ist auch in Gegenwart von 6 M Harnstoff der Fall. Diese Harnstoffkonzentration führt durch die Aufhebung von Wasserstoffbrücken-

bindungen und durch Schwächung hydrophober Wechselwirkungen zu einer weitgehenden Entfaltung des Proteins und damit zu einer Denaturierung (46).

Die vollständige Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase erfolgt recht langsam. Sie wird erst nach 16 h erreicht (vgl. Abb. 28). Im Vergleich dazu läßt sich die Isocitrat-Dehydrogenase aus *H. cutirubrum* bereits in 90 min (25) vollständig reaktivieren. Das pH-Optimum (7,8) für die Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase entspricht nicht dem pH-Optimum für die von dem Enzym katalysierte Reaktion (pH 9,0). Gleiches gilt für die Malat-Dehydrogenase aus *H. salinarium*, bei der das pH-Optimum für die Reaktivierung bei pH 8,7 und für die enzymatische Reaktion bei pH 7,2 liegt (23), während unter entsprechenden Bedingungen bei der Isocitrat-Dehydrogenase aus *H. cutirubrum* das pH-Optimum für beide Prozesse bei pH 7,5 liegt (25).

Auffällig ist, daß das Temperaturoptimum für die Reaktivierung der Alanin-Dehydrogenase (30° C, siehe Abb. 29) wesentlich niedriger liegt als das Temperaturoptimum der katalytischen Reaktion (65° C in Gegenwart von NaCl, 70° C in Gegenwart von KCl; s. Abb. 16).

In diesem Verhalten gleichen sich die Alanin-Dehydrogenase aus *H. salinarium* und die

Malat-Dehydrogenase aus dem gleichen Organismus (23) sowie die Isocitrat-Dehydrogenase aus *H. cutirubrum* (25) vollständig.

Biologische Makromoleküle wie Nucleinsäuren sowie Mukopolysaccharide und Proteine liegen im physiologischen pH-Bereich als Polyelektrolyte vor. Dies ermöglicht häufig das Vorkommen von metastabilen Zuständen. Dabei können im Laufe des Überganges von einem Zustand in einen zweiten ausgeprägte Hysteresephänomene auftreten (45). Abbildung 31 zeigt dies für die Änderung der katalytischen Aktivität der Alanin-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Das Enzym liegt dabei in salzfreier Lösung wie in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen in einem metastabilen Zustand vor. Die Hystereseerscheinungen an derartigen Proteinen sollen dabei vor allem durch Änderungen des elektrostatischen Zustandes der Oberfläche des Makromoleküls hervorgerufen werden (45). Für die Malat-Dehydrogenase aus einem nicht näher definierten Halobakterium ist dabei eine Assoziations-Dissoziations-Reaktion zwischen den vier Untereinheiten eines tetrameren Enzymkomplexes postuliert worden (45).

Ob entsprechende Verhältnisse bei der Alanin-Dehydrogenase vorliegen, wird in weiteren Experimenten durch Bestimmung des Aggregationszustandes der

aktiven und inaktiven Form des Enzyms mittels Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge zu klären sein.

Die reversiblen Aktivitätsänderungen der Alanin-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Salzkonzentration sowie die Bedeutung von SH-Gruppen für diese Vorgänge legen die Vermutung nahe, daß das Protein in Abhängigkeit von der Salzkonzentration Konformationsänderungen unterliegt. Dies wird bestätigt durch Messungen des Zirkulardichroismus - CD - (Abb. 32, Tabelle 6) und der optischen Rotationsdispersion - ORD - am aktiven, inaktivierten und denaturierten Enzym (Abb. 34).

Eine fortlaufende Verminderung der Salzkonzentration führt zu einer Entfaltung des Moleküls der Alanin-Dehydrogenase. Dies führt dazu, daß bei vollständiger Inaktivierung die α -Struktur fast vollständig verschwindet, die β -Struktur um die Hälfte reduziert wird und der Gehalt an "ungeordneter" ρ -Struktur dementsprechend ansteigt.

Die Einwirkung von denaturierendem Harnstoff auf das Molekül führt ebenfalls zu Konformationsänderungen, die schließlich mit dem völligen Verschwinden der α - und β -Struktur und einem entsprechenden Anstieg an "ungeordneter" ρ -Struktur verbunden sind.

Die Ursache für die Aktivitätsabnahme bei der Inaktivierung bzw. für den Aktivitätsverlust bei der

Denaturierung ist somit mit der Verringerung bzw. dem völligen Verlust der Sekundärstruktur verknüpft.

Eine langsame Erhöhung der Salzkonzentration führt umgekehrt am inaktivierten Enzym zu einer Zunahme der Sekundärstruktur und damit zu einem erhöhten Ordnungszustand des Enzymmoleküls, was mit einem entsprechenden Anstieg der katalytischen Aktivität verbunden ist. Dieser Vorgang ist erwartungsgemäß an dem mit Harnstoff denaturierten Protein weniger ausgeprägt.

Besonders eindrucksvoll ist, daß sich eine Parallelität zwischen der Aktivität des Enzyms (Tabelle 6) und dem Gehalt an α -Struktur ergibt. In einer grob quantitativen Analyse sind WULFF et al (65) an der Isocitrat-Dehydrogenase aus *H. cutirubrum* zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt.

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, daß die Alanin-Dehydrogenase aus *H. salinarium* ein sehr geeignetes Objekt für die Analyse des Zusammenhanges zwischen der Konformation und der Aktivität eines halophilen Enzyms ist. Es erscheint lohnend, in künftigen Untersuchungen insbesondere die Primärstruktur des Enzyms und ihre Bedeutung für Aktivität und Konformation, die Frage des Aggregationszustandes verschiedener Formen

des Enzyms und den Einfluß der Raumstruktur des Enzyms auf seine Affinität zu verschiedenen Substraten zu untersuchen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Für acht Enzyme aus *H. salinarium* und aus *H. cutirubrum* wird gezeigt, daß diese halophilen Enzyme ausnahmslos auch thermophil sind.
2. Aus *H. salinarium* wird die Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1.) etwa 800-fach angereichert. Das Enzym erweist sich elektrophoretisch sowie in der Elektrofocussierung als homogen.
3. Das Molekulargewicht des Enzyms wird mittels Sephadex-Gelfiltration zu 60.000 und in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu 58.000 bestimmt. Hinweise für trennbare Untereinheiten ergeben sich nicht.
4. Das Enzym ist nur aktiv in Gegenwart von mindestens 2 M NaCl. NaCl ist durch eine Reihe von anderen Salzen ersetzbar.
5. Das Temperaturoptimum für die katalysierte Reaktion liegt in Gegenwart von 3,5 M NaCl bei 65° C, in Gegenwart von 3,5 M KCl bei 70° C. Das pH-Optimum liegt bei pH 9,0.
6. Für die Substrate werden in Gegenwart von 3,5 M NaCl folgende Km-Werte bestimmt; $(7,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ für NADH, $9,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ für Pyruvat und $6,0 \cdot 10^{-1}$ für NH_4Cl). Diese ändern sich in Gegenwart von 3,5 M KCl geringfügig, in Gegenwart von 3,5 M NaNO_3 jedoch erheblich.

7. Das Enzym wird durch Entzug von NaCl inaktiviert und kann durch Zugabe von NaCl und 2-Mercaptoäthanol vollständig reaktiviert werden. Die salzabhängige Reaktivierung zeigt ein charakteristisches Hysterese-Phänomen.
8. Von aktiven inaktivierten und reaktivierten Enzymen werden CD- und ORD-Spektren aufgenommen. Aus den CD-Spektren läßt sich der Gehalt an α -, β - und ρ -Struktur errechnen. Es zeigt sich ein enger Zusammenhang zwischen der Aktivität der Enzyme und dem Gehalt an α -Struktur.

LITERATUR

1. Andrews, P. (1964) "Estimation of the molecular weight of proteins by sephadexfiltration" Biochem. J. 91, 222 - 233.
2. Baley, S.T., and Kushner, D.J. (1964) "The ribosomes of the extremely halophilic bacterium, halobacterium cutirubrum" J. Mol. Biol. 9, 654 - 666.
3. Baley, S.T., and Griffiths, E. (1968) "A cell-free amino acid incorporation system from an extremely halophilic bacterium" Biochemistry 7, 2249 - 2256.
4. Baxter, R.M. (1959) "An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of halobacterium salinarium" Can. J. Microbiol. 5, 47 - 57.
5. Buchanan, R.E., and Gibbon, N.E. (1974) "Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 8th ed.; The Williams and Wilkins Company, Baltimore pp. 269 - 273.
6. Chen, Y.H., Yang, J.T., and Martinez, H.M. (1972) "Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion" Biochemistry 11, 4120 - 4131.
7. Christian, J.H.B., and Waltho, J.A. (1962) "Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria" Biochim. Biophys. Acta 65, 506 - 508.

8. Determann, H., and Michel, W. (1966) "The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins" *J. Chromatog.* 25, 303 - 313.
9. Dorfner, K. (1970) "Ionenaustauscher" 3. Aufl.; Walter de Gruyter & Co., Berlin; pp.88 - 94.
10. Evans, H.J., and Sorger, G.J. (1966) "Role of mineral element with emphasis on the univalent cations" *Annu. Rev. Plan. Physiol.* 17, 47 - 76
11. Ginzburg, M., Sachs, L., and Ginzburg, B.Z. (1970) "Ion metabolism in a halobacterium. Influence of age of culture on intracellular concentrations" *J. Gen. Physiol.* 55, 187 - 207.
12. Gonhauer, M.B., and Kushner, D.J. (1961) "Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria" *Can. J. Microbiol.* 15, 1157 - 1165.
13. Gratzner, W.B., and Gowburn, D.A. (1969) "Optical activity of biopolymers" *Nature* 222, 426 - 431.
14. Green, A.A., and Hughes, W.L. (1955) "Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents", in: *Methods in Enzymology*, Vol. 1; Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., Eds; Academic Press Inc. Publisher, New York, pp. 67 - 90.
15. Hatefi, Y., and Hanstein, W.G. (1969) "Solubilization of particulate proteins and non electrolytes by chaotropic agents" *Proc. Nat. Acad. Soc.* 62, 1129 - 1135.

16. Havar, E.A., Tamir, H., Rattner, S., and Warner, R.C. (1965) "Biosynthesis of Urea. Purification and properties of crystalline Argino-succinase" J. Biol. Chem. 240, 3079 - 3088.
17. Henis, Y., and Even, J. (1963) "Preliminary studies on the microflora of a highly saline soil" Can. J. Microbiol. 9, 902 - 904.
18. Higa, A.I., Vidal, M.C., and Cazzulo, J.J. (1974) "Activation and stabilization of halophilic enzymes by magnesium and calcium ions" Experientia 30, 462 - 463.
19. Hochstein, L.I., and Dalton, B.P. (1968) "Salt specificity of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase prepared from a halophilic bacterium" J. Bacteriol. 95, 37 - 42.
20. Hochstein, L.I., and Dalton, B.P. (1973) "Studies of a halophilic NADH-dehydrogenase. Purification and properties of the enzyme" Biochim. Biophys. Acta 302, 216 - 228.
21. Holmes, P.K., and Halvorson, H.O. (1963) "The inactivation and reactivation of salt-requiring enzymes from an extreme obligate halophile" Can. J. Microbiol. 9, 904 - 906.
22. Holmes, P.K., and Halvorson, H.O. (1965) "Purification of a salt-requiring enzyme from an obligately halophilic bacterium" J. Bacteriol. 90, 312 - 315.

23. Holmes, P.K., and Halvorson, H.O. (1965) "Properties of a purified halophilic malic-dehydrogenase" J. Bacteriol. 90, 316 - 326.
24. Hubbard, J.S., and Miller, A.B. (1969) "Purification and reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase from an obligate halophile" J. Bacteriol. 99, 161 - 168.
25. Hubbard, J.S., and Miller, A.B. (1970) "Nature of the inactivation of the isocitrate dehydrogenase from an obligate halophile" J. Bacteriol. 102, 677 - 681.
26. Keradjopoulos, D., and Wulff, K. (1974) "Thermophilic alanin-dehydrogenase from halobacterium salinarium" Can. J. Biochem. 52, 1033 - 1037.
27. Kates, M., Yergoyan, L.S., and Sastry, P.S. (1963) "Isolation and characterization of a diether analog of phosphatidyl glycerophosphate from halobacterium cutirubrum" Biochim. Biophys. Acta 70, 705 - 707.
28. Kunau, W., and Stoeckenius, W. (1968) "Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of halobacterium halobium and isolation of gas vacuole membranes" J. Cell. Biol. 38, 337 - 357.
29. Kushner, D.J. (1968) "Halophilic bacteria" Advan. Appl. Microbiol. 10, 73 - 97.

30. Lanyi, J.K., and Stevenson, J. (1970) "Studies of electron transport of extremely halophilic bacteria. Role of hydrophobic forces in the structure of menadione reductase" J. Biol. Chem. 245, 4074 - 4080.
31. Larsen, H. (1962) "Halophilism" in: Gunsalus, I.C., and Stanier, R.Y., Eds.; The Bacteria, Vol. 4, Academic Press Inc., New York, pp. 297 - 342.
32. Larsen, H. (1967) "Biochemical aspects of extreme halophilism" in: Rose, A.H., and Wilkinson, J.F., Eds.; Advan. in microbial Physiol., Vol. 1, Academic Press Inc., New York, pp. 97 - 132.
33. Levin, Ö. (1971) "Column chromatography of proteins: calciumphosphate" in: Jakobi, W.B., Ed.; Methods in Enzymology, Vol. 22, Academic Press, New York and London, pp. 325 - 339.
34. Liebermann, M.M., and Lanyi, J.K. (1972) "Threonine deaminase from extremely halophilic bacteria. Co-operative substrate kinetics and salt dependence" Biochemistry 11, 211 - 216.
35. Lineweaver, H., and Burk, D. (1934) "The determination of enzyme dissociation constants" J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 - 666.
36. Lotze, F. (1957) "Steinsalze und Kalisalze" 2. Aufl.; Gebrüder Borntraeger, Berlin, pp. 92 - 94.
37. Louis, B.G., and Fitt, P.S. (1972) "Isolation and properties of highly purified halobacterium cutirubrum deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase" Biochem. J. 127, 69 - 80.

38. Louis, B.G., and Fitt, P.S. (1972) "Purification and properties of the ribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase from halobacterium cutirubrum" *Biochem. J.* 128, 755 - 762.
39. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) "Protein measurements with the Folinphenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
40. MacDonald, R.E., and Lanyi, J.K. (1975) "Light-induced leucine transport in halobacterium halobium envelope vesicles. A chemiosmotic system" *Biochemistry* 14, 2882 - 2889.
41. Marquez, E.D., and Brodie, A.E. (1973) "The effect of cations on the heat stability of a halophilic nitrate reductase" *Biochim. Biophys. Acta* 321, 84 - 89.
42. Maurer, H.R. (1968) "Disk-Elektrophorese"; Walter de Gruyter & Co., Berlin, pp. 39 - 46.
43. Mohr, V., and Larsen, H.J. (1963) "On the structure transformation and lysis of halobacterium salinarium in hypotonic and isotonic solutions" *J. Gen. Microbiol.* 31, 267 - 280.
44. Némethy, G. (1967) "Hydrophobe Wechselwirkungen" *Ang. Chem.* 79, 260 - 271.
45. Neumann, E. (1973) "Molekulare Hysterese und ihre kybernetische Bedeutung" *Ang. Chem.* 85, 430 - 444.

46. Nozaki, Y., and Tanford, C. (1968) "The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions" J. Biol. Chem. 238, 4074 - 4081.
47. Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1973) "Function of a new photoreceptor membrane" Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2853 - 2857.
48. Onishi, H., McCance, M.E., and Gibbons, N.E. (1965) "A synthetic medium for extremely halophilic bacteria" Can. J. Microbiol. 11, 365 - 373.
49. Pugh, E.L., Wassef, M.K., and Kates, M. (1971) "Inhibition of fatty acid synthetase in halobacterium cutirubrum and E. coli by high salt concentrations" Can. J. Biochem. 49, 953 - 958.
50. Rosenberg, A., and Lumery, R. (1964) "The reversible transconformation processes of yeast enolase" Biochemistry 3, 1055 - 1061.
51. Rosenkranz, H., and Schlotan, W. (1971) "Circular-dichroismus und Konformation der L-Asparaginase" Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 1081 - 1090.
52. Saxena, V.P., and Wetlaufer, D.B. (1971) "A new basis for interpreting the circular dichroism spectra of proteins" Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 969 - 972.
53. Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V. (1967) "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels" Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820.

54. Sheraga, H.A., Némethly, G., and Steinberg, I.Z.
(1962) "The contribution of hydrophobic bands to the thermal stability of protein conformations" J. Biol. Chem. 237, 2506 - 2508.
55. Singleton, R., and Amelunxen, R.E. (1973) "Proteins from thermophilic microorganisms" Bacteriol. Rev. 37, 320 - 342.
56. Snatzke, G. (1968) "Circular dichroismus und optische Rotationsdispersion. Grundlagen und Anwendung auf die Untersuchung der Stereochemie von Naturstoffen" Ang. Chem. 80, 15 - 26.
57. Stevenson, J. (1966) "The specific requirement for sodium chloride for the active uptake of L-glutamate by halobacterium salinarium" Biochem. J. 99, 257 - 260.
58. Strøm, A.R., and Visentin, L.P. (1973) "Acidic ribosomal proteins from the extreme halophile, halobacterium cutirubrum. The simultaneous separation, identification and molecular weight determination" FEBS-Letters 37, 274 - 280.
59. Suelter, C.H. (1970) "Enzymes activated by monovalent cations" Science 168, 789 - 795.
60. Tomlinson, G.A., and Hochstein, L.I. (1972) "Isolation of carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacteria" Can. J. Microbiol. 10, 698 - 701.

61. Walter, H. (1968) "Einführung in die Phytologie. Grundlagen der Pflanzenverbreitung, 2. Auflage, Band 3/1, Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 477 - 491.
62. Weber, K., and Osborn, M. (1969) "The reliability of molecular-weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamidgel-electrophoresis" J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.
63. Wedler, F.C., and Hoffmann, F.M. (1974) "Glutamine synthetase of bacillus stearothermophilus. Purification and basic properties" Biochemistry 13, 3207 - 3214.
64. Wrigley, G.W. (1968) "Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel-electrofocussing" J. Chromatog. 36, 362 - 365.
65. Wulff, K., Hubbard, J.S., and Miller, A.B. (1972) "Reversible inactivation of the isocitrate-dehydrogenase from a obligate halophile: Changes in the secondary structure" Arch. Biochem. Biophys. 148, 318 - 319.
66. Yoshida, A., and Freese, E. (1964) "Purification and chemical characterization of alanine-dehydrogenase of bacillus subtilis" Biochim. Biophys. Acta 92, 33 - 43.

Lebenslauf

Am 24.5.1941 wurde ich als Sohn des Oberst Georgios Keradjopoulos und seiner Ehefrau Efthalia, geb.

Siomandi in Thessaloniki/Griechenland geboren. Nach dem Besuch der Volksschule und des humanistischen Gymnasiums in Thessaloniki legte ich im Sommer 1959 die Reifeprüfung ab. Nach der Absolvierung eines Deutschkurses an der Universität Tübingen immatrikulierte ich mich dort im Sommersemester 1964 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät (Fächer: Biologie, Chemie, Physik). Ab Wintersemester 1965 setzte ich das Studium an der Universität Bonn fort und schloß es im Wintersemester 1969 mit der Diplomprüfung für Biologen ab. Vom Sommersemester 1970 bis Sommersemester 1972 war ich am Institut für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig.

Meine Dissertation fertigte ich von September 1972 bis September 1975 am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum unter Anleitung von Professor Dr. A.W. Holldorf an.

Bamberger Fotodruck *Schadel & Wehle*
GmbH & Co. KG.
86Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Tel. 0951/21617 [5 4414]